

11.

Príloha č. 2

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Názov projektu: Vplyv haloperidolu a olanzapínu na neurogenézu a apoptózu v schizofrenickom modeli

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3203/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

- schizofrénia, antipsychotiká, neurogenéza, apoptóza

Účel projektu: základný výskum

Opísať ciele projektu:

Súhrnným cieľom predloženého projektu je zistiť vplyv subchronického podávania typického alebo atypického antipsychotika (haloperidol/olanzapín) na neurogenézu a apoptózu v *in vivo* modeli schizofrénie vo vybraných mozgových oblastiach.

V animálnom modeli schizofrénie, ktorá bude navodená aplikáciou dizocilpínu budeme sledovať efekt vyššie uvedených antipsychotík (haloperidol a olanzapín) na:

- 1/ neurogenézu detekovanú prostredníctvom expresie BrdU v oblasti hipokampu (*gyrus dentatus*) a subventrikulárnej zóne
- 2/ expresiu vybraných markerov neurogenézy (doublekortín, reelin, Notch1, Hes, BDNF) a apoptózy (Bcl-2, Bcl-Xl, Bax, p53, Apaf-1) v hipokampe
- 3/ aktivitu vybraných oblastí mozgu (prefrontálny kortex, striatum, septum, hipokampus), ktorá bude určená prostredníctvom detekcie c-Fos proteínu v neurónoch (pomocou NeuN ako neuronálneho markera), resp. astrocytoch (pomocou gliálneho fibrilárneho kyslého proteínu)
- 4/ behaviorálne parametre v danom modeli (test rozpoznávania nového objektu, Morrisovo vodné bludisko)

Prínos z vykonaného projektu:

Predchádzajúce experimentálne štúdie poukázali pri schizofrénii na zmeny v signálnych dráhach/proteínoch zapojených do regulácie embryonálneho vývinu, pričom niektoré z týchto dráh zohrávajú dôležitú úlohu aj v dospelom mozgu a sú zapojené do neurogenézy. Popri zmenách v neurogenéze sa predpokladá, že v patológii schizofrénie zohráva úlohu aj apoptóza. Avšak o vplyve antipsychotík na neurogenézu a apoptózu v mozgu indukovanú schizofréniou je zatiaľ málo dostupných informácií. Preto cieľom predloženého projektu je priniesť nové poznatky o vplyve typických (haloperidol), resp. atypických (olanzapín) antipsychotík na patologické zmeny v neurogenéze a apoptóze indukované schizofréniou. Predpokladáme, že typické a atypické antipsychotiká budú neurogenézu a apoptózu ovplyvňovať odlišne, keďže na bunky pôsobia prostredníctvom iných receptorov a ovplyvňujú iné mechanizmy. Veríme, že získané poznatky pomôžu k lepšiemu porozumeniu podstaty ochorenia, prípadne novým cielenejším farmakologickým prístupom, ktoré umožnia korigovať abnormálne zmeny v neurogenéze/apoptóze vyvolané schizofréniou.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V plánovaných experimentoch budeme využívať iba samce laboratórnych potkanov kmeňa Sprague-Dawley, 148 dospelých jedincov.

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

Vzhľadom nato, že laboratórnym potkanom budeme intraperitoneálne podávať farmaká počas 13 dní a anestetiká pred transkardiálnou perfúziou, zvieratá budú pri injikovaní pociťovať krátkodobú slabú bolesť, prípadne prechodný diskomfort a nepohodlie po podaní injekcie.

Podanie dizocilpínu spôsobuje u hlodavcov abnormálne zmeny vo viacerých neurotransmiterových systémoch v mozgu (predovšetkým dopaminergickom a glutamatergickom), ktorých dôsledkom sú behaviorálne zmeny ako zvýšená spontánna aktivita, stereotypné správanie, kognitívne poruchy. Je pravdepodobné, že v dôsledku týchto zmien bude stredne narušená pohoda a celkový stav zvierat, preto tieto postupy a stav zvierat z hľadiska krutosti označíme ako stredné.

Vystavenie zvierat behaviorálnym testom (test rozpoznávania nového objektu, Morrisovo vodné bludisko) tiež predstavuje istý diskomfort a prechodné nepohodlie a tieto postupy z hľadiska krutosti hodnotíme ako slabé.

Predpokladaná úroveň krutosti:

MANIPULÁCIA SO ZVIERATAMI	MIERA KRUTOSTI
váženie zvierat	slabá
označovanie zvierat na chvoste permanentným perom	slabá
behaviorálne testy (test rozpoznávanie nového predmetu, Morrisovo vodné bludisko)	slabá
opakované i.p. podávanie farmák (fyziologický roztok, dizocilpín, antipsychotiká, BrdU)	stredná
schizofrénii podobný stav navodený i.p. podávaním dizocilpínu	stredná
CELKOVÁ KLASIFIKÁCIA	STREDNÁ

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat

Schizofréniu a vplyv vybraných antipsychotík na neurogenézu a apoptózu pri tomto ochorení je možné študovať len na animálnom modeli s dostatočne vyvinutým nervovým systémom. Preto nie je možné navrhovaný experiment realizovať na systematicky nižšom druhu živočíchov a ani za využitia počítačovej simulácie. Je nevyhnutné využiť dospelé samce potkanov kmeňa Sprague-Dawley, keďže sú jedným z najčastejšie v literatúre používaných modelov. Aj experimenty v medzinárodnom merítku s podobnou tematikou sa prevádzajú hlavne na potkanoch.

2. Redukcia počtu zvierat

Počet zvierat v experimentálnych skupinách je minimalizovaný na najmenšiu možnú hranicu tak, aby získané údaje boli štatisticky relevantné, vedecky hodnoverné a mali aj požadovanú výpovednú hodnotu.

3. Zjemnenie

Zvieratá budú držané v klietkach po 2 za prísunu peletovanej stravy a vody *ad libitum*, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. U zvierat bude po aplikácii farmák denne sledovaný ich zdravotný stav. Ak dôjde k zníženiu príjmu potravy, vody a hmotnosti zvierat'a, alebo budeme pozorovať zmeny v jeho vzhľade a správaní oproti prirodzenému/provokovanému správaniu budeme to konzultovať s veterinárnym lekárom, prípadne pristúpime k usmrteniu zvierat'a podaním letálnej dávky pentobarbitalu (100 mg/kg zvierat'a), podľa dosiahnutého skóre určeného na základe číselného ohodnotenia ukazovateľov stanovených v tabuľke s humane end points. Utrpenie zvierat nebudeme znižovať nijakým iným spôsobom, keďže by to mohlo ovplyvniť nami sledované parametre

(napr. podávanie utlmujúcich látok by ovplyvnilo pôsobenie dizocilpínu a antipsychotík, obohatenie prostredia by malo vplyv na neurogenézu). Všetky postupy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej strádali. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno nie

Príloha 4: Netechnické zhrnutie projektu podľa § 40 nariadenia vlády

Názov projektu: Význam coxsackievírusovej infekcie počas gravidity

Číslo konanie rozhodnutia o schválení projektu: 3354/18-221/3

Kľúčové slová: myši, coxsackievírusová infekcia, prenos infekcie počas gravidity, vakcína

Účel projektu: základný výskum

Budeme sledovať patogenézu EV, budeme sa snažiť pochopiť antivírusovú aktivitu v zmysle redukcie replikácie vírusu v rôznych orgánoch infikovaných myší, v závislosti od času po infekcii, histopatologických zmien a imunitnej odpovede a spôsob podporenia novej stratégie pre antivírusovú terapiu.

Cieľ projektu:

Cieľom projektu je získať exaktné poznatky o patogenéze coxsackievírusovej infekcie pri perorálnej infekcii. Vzhľadom k tomu, že v súčasnosti sú k dispozícii prevažne údaje o priebehu infekcie po parenterálnej aplikácii vírusu, ale prirodzená cesta infekcie enterovírusmi u ľudí je alimentárna, je experiment zameraný na podrobné štúdium účasti črevného imunitného systému pri rozvoji infekcie a vzniku ochorenia. Na štúdie sa používali štandardné laboratórne kmene vírusov.

Ďalej našim cieľom je zistiť vplyv orálnej infekcie coxsackievírusom B3 (kmeň Nancy) na priebeh gravidity samíc infikovaných v jednotlivých štádiách gravidity. Sledovať prenos CVB3 (Nancy) z infikovanej samice na plod počas prenatalného obdobia. Štúdium vplyvu infekcie coxsackievírusom B3 (Nancy) na mláďatá, ktorých matky boli infikované počas gravidity. A tiež našim cieľom je študovať vplyv monovalentnej vakcíny na priebeh gravidity a imunity mláďat.

Prínos projektu:

- I) Projekty nepredpokladajú ekonomické prínosy.
- II) Výsledky navrhovanej štúdie pomôžu porozumieť problému patogenézy coxsackievírusovej infekcie s využitím experimentálneho systému a spoznať patologický potenciál, vrátane genetických determinantov virulencie u prenosných ochorení
- III) Výsledky navrhovanej štúdie umožnia zaviesť novú stratégiu: preventívne opatrenia (očkovanie), ak je matka infikovaná počas gravidity
- IV) Výsledky navrhovanej štúdie by mohli byť základom pre budúce štúdie vakcinačného programu, pre objasnenie mechanizmu rozvoja detských a chronických chorôb, a tiež pre štúdie súvisiace s prevenciou týchto ochorení.
- V) Doposiaľ neexistuje vakcinácia proti CVB vírusom. Máme možnosť skúmať účinnosť monovalentnej vakcíny. Naš model infekcie gravidných myší (Bopegamage *et al.*, 2012) je vhodný pre štúdie infekčných agensov.

Vďaka podobnosti mCAR receptoru u myší a CAR receptoru u ľudí, modelovým organizmom štúdia patogenézy coxsackievírusov je najvhodnejším modelom je myš (*Mus musculus*). Patogenéza a šírenie coxsackievírusu v organizme sa nedá skúmať na ľudskej populácii. Preto plánované projekty nám pomôžu rozumieť mechanizms imunitného systému hostiteľa.

Počet a druh zvierat: Myš (*Mus musculus*), CD1 outbrédne myši;
Celkový počet zvierat za trvanie projektu: 578,

Samce: 53, Samice: 105, Mlád'atá: 420 (samce aj samičky).

Úroveň krutosti: Celkové hodnotenie krutosti skúšky: slabá - stredná

Analýzy projektov, pokiaľ ide o pomer ujmy a prínosu, ukazujú, že ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu odôvodnená očakávaným výsledkom s ohľadom na etické aspekty je v prospešná ľuďom (hore uvedený body II, III, IV a V str. 1).

Po zhodnotení literárnych zdrojov v súčasnej dostupnej vedeckej literatúre zameranej na hľadanie alternatívnych laboratórnych techník, navrhovaný projekt pokusu plne rešpektuje zásadu 3R, projekt je v súlade s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Replacement: Na súčasnom stupni vedeckého poznania neexistuje dostatočne validovaný *in vitro* alternatívny spôsob sledovania patogenézy vírusových infekcií, t.j. nie je známa náhrada použitia zvierat v uvedenom projekte (prílohy č. 5, 6, 7). U ľudí nie je reálne možné sledovať patogenézu vírusových infekcií a kinetiku deštrukcie buniek. Navrhnutý zvierací druh – myši. Myšací model, vzhľadom na podobnosť priebehu infekcie s ľuďmi vďaka prítomnosti mCAR receptoru, je vhodným prostriedkom na štúdium ochorení spôsobených coxsackievírusmi. Z uvedených dôvodov je nutné vykonať štúdie na zvieratách. Všetky pokusy budú vykonané podľa doporučenej a schválenej metodiky „Nariadenie vlády SR č. 377/2012 Z. z. § 12“.

Refinement (zjemnenie manipulácie so zvieratami): v našich projektoch nebudú vykonané bolestivé zákroky pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť. Slabá - stredná bolesť môže byť spôsobená systémovou reakciou na orálne podanú látku ako vraciaci reflex.

Reduction (obmedzenie počtu zvierat): Predpokladaný počet zvierat potrebných na pokus je minimalizovaný na najmenšiu možnú mieru, aby sa však zaručila štatistická validita údajov. Akékoľvek zníženie počtu zvierat môže viesť k zníženiu validity a štatistických kalkulácii preukaznosti pokusu a nevyhnutnosti jeho opakovania. Kvôli tomu máme redukované počty zvierat na každý interval pitvy aj sú redukované intervaly sledovania patogenézy (to znamená pitvy). Bezbolestné usmrtenie zvierat, najhumánnejší spôsob je predávkovanie anestetikom.

Eutanáziu zvierat vykonáva poverený ošetrovateľ v miestnosti na to určenej. Eutanázia (v konkrétnych prípadoch podľa plánu pokusu, ktoré nepitveme a sú určené na pozorovanie) sa prevedie intraperitoneálne podaním thiopentabarbiturátu. Bez možnosti zotavenia: postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii. Human end point: Coxsackievírusová infekcia nespôsobuje výraznú bolesť ani utrpenie, ani smrť (preto ich patogenéza nie je objasnená). Preto projekty končia posledným dňom pozorovania po infekcii (pitvou).

Projekt nie je potrebné spätne posúdiť

Príloha č. 2 :

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

Názov projektu: 3502/18-221/3

Imunizácia králikov natívnymi včelími antigénmi a ich rekombinantnými ekvivalentami

Kľúčové slová v projekte: imunizácia, natívne včelie antigény, séra králikov

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

Cieľom projektu je získavanie hyperimúnného séra po imunizácii králikov pre aplikovaný výskum pri vývoji a výrobe diagnostík, z ktorých sa budú purifikovať protilátky. Získané protilátky sa použijú pri výskume imunitného potenciálu včiel pre vývoj nových, ekologicky jemných liečiv pre ochranu včelstiev voči chorobám, ďalej pre hodnotenie pravosti a kvality včelích produktov ako výživových doplnkov, prípadne ich použitia v apiterapii.

Prínosom bude rýchla a pomerne jednoduchá imunochemická detekcia sledovaných látok (včelích proteínov/peptidov) s cieľom ich využitia v klinickej praxi veterinárnej medicíny.

Získanie krvných sér s plánovaným využitím pri výrobe diagnostík **prínos** projektu výrazne prevyšuje **ujmu** u experimentálnych králikov.

Predpokladaná **ujma** na použitých zvieratách bude len v diskomforte pri fixácii králikov počas aplikácie natívnych/rekombinantných včelích antigénov i odberoch krvi počas postupu postupu pri zásahoch raz za 70 dní opakovane podľa imunizačnej schémy. Samotný úkon však bude krátkodobý nespôsobujúci dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i analgetík. V prípade výskytu bolestivých stavov sa použije analgetikum Novasul, 0,1 ml/kg, i.m..

V jednotlivých častiach projektu sa použije celkom 300 dospelých králikov, samcov i samíc (kmeň Hil - Novozélandský biely x Kalifornský králik) vo veku 4-6 mesiacov. Imunizácia králikov sa vykoná injekčným podaním natívneho/rekombinantného včelieho antigénu v adjuvanse subkutánnou aplikáciou do lopatkovej oblasti na chrbte. Zvieratá budú fixované vo fixačných klietkach v krátkom časovom úseku, aby sa nevyvolával zbytočný stres a bolesť. Za účelom získavania krvného séra sa uskutočnia odbery krvi z ušnej artérie (cca 50 ml) opakovane jeden raz za 70 dní. Králiky sa budú fixovať vo fixačných klietkach a zákrok sa vykoná v čo najkratšom čase. Zvieratám bude počas celého projektu 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

Aplikácia antigénu s.c.- slabá

Prežívanie zvierat po aplikácii - slabá

Poaplikačný stav - slabá

Individuálne umiestnenie počas celého projektu v štandardných klietkach pre králikov – slabá

Fixácia zvierat vo fixačnej klietke do 10 minút - slabá

Odber krvi z centrálnej ušnej artérie opakovane jeden raz za 70 dní - stredná.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda produkcie krvného séra pre výrobu medicínskych produktov. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre získavanie krvi nie je možné v projekte nahradiť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre získavanie dostatočného množstva krvného séra.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bolo zabezpečené dostatočné množstvo krvného séra potrebného pri výrobe diagnostík. Použijú sa samce aj samice, keďže pohlavie nevyplýva na imunizáciu sér. V rámci šetrenia sa nebudú zaraďovať nové jedince do skupín jednotlivých natívnych/rekombinantných včelích antigénov, ak zdravotný i kondičný stav umožní použiť overeného králika.

Zásada zjemnenia (refinement)

Nakoľko pri použití opakovanej dávky jednotlivých natívnych/rekombinantných včelích antigénov pre zvieratá v danej skupine sa jedná o dlhodobý projekt, v ktorom dobrý zdravotný stav a dobrá kondícia zvierat hrajú veľmi dôležitú úlohu, starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Králiky budú mať k dispozícii dostupné prostriedky zlepšujúce ich životné podmienky v projekte. Postupy používané pri aplikáciách i odberoch krvi majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú taktiež vykonávané skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Pri výskyte bolestivých stavov sa postihnutému jedincovi podá prostriedok na zníženie bolesti (Novasul, 0,1 ml/kg, i.m.). Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokéj celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha č. 2 :

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

Názov projektu: 3502/18-221/3a

Imunizácia králikov antigénmi DB

Kľúčové slová v projekte: imunizácia, rekombinantné antigény, séra králikov

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

Cieľom projektu je získavanie hyperimúnného séra po imunizácii králikov pre aplikovaný výskum pri vývoji a výrobe diagnostík, z ktorých sa budú purifikovať protilátky. Získané protilátky sa použijú pri vývoji a výrobe komerčných ELISA kitov pre humánnu medicínu. Tieto sa plánujú využívať pri detekcii proteínov, ktoré sú súčasťou metabolických procesov v ľudskom tele, ako aj procesov tvorby nádorov.

Očakávaným **prínosom** projektu bude rýchla a pomerne jednoduchá diagnostika závažných ochorení a patologických stavov v humánnej medicíne. Získanie krvných sér s plánovaným využitím pri výrobe diagnostík pre zisťovanie ochorení človeka **prínos** projektu výrazne prevyšuje **ujmu** u králikov.

Predpokladaná **ujma** na použitých zvieratách bude v diskomforte pri fixácii králikov počas aplikácie antigénov i odberoch krvi počas postupu pri zásahoch raz za 70 dní opakovane podľa imunizačnej schémy. Samotný úkon však bude krátkodobý nespôsobujúci dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i analgetík. V prípade výskytu bolestivých stavov sa použije analgetikum Novasul, 0,1 ml/kg, i.m..

V jednotlivých častiach projektu sa použije celkom 300 dospelých králikov, samcov i samíc (kmeň HIL - Novozélandský biely x Kalifornský králik) vo veku 4-6 mesiacov. Imunizácia králikov sa vykoná injekčným podaním antigénu DB v adjuvanse subkutánnou aplikáciou do lopatkovej oblasti na chrbte. Zvieratá budú fixované vo fixačných klietkach v krátkom časovom úseku, aby sa nevyvolával zbytočný stres a bolesť. Za účelom získavania krvného séra sa uskutočnia odbery krvi z ušnej artérie (cca 50 ml) opakovane jeden raz za 70 dní. Králiky sa budú fixovať vo fixačných klietkach a zákrok sa vykoná v čo najkratšom čase. Zvieratám bude počas celého projektu 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

Aplikácia antigénu s.c.- slabá

Prežívanie zvierat po aplikácii - slabá

Poaplikačný stav - slabá

Individuálne umiestnenie počas celého projektu v štandardných klietkach pre králikov – slabá

Fixácia zvierat vo fixačnej klietke do 10 minút - slabá

Odber krvi z centrálnej ušnej artérie opakovane jeden raz za 70 dní - stredná.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda produkcie krvného séra pre výrobu medicínskych produktov. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre získavanie krvi nie je možné v projekte nahradiť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre získavanie dostatočného množstva krvného séra.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bolo zabezpečené dostatočné množstvo krvného séra potrebného pri výrobe diagnostík. Použijú sa samce aj samice, keďže pohlavie nevplyva na imunizáciu sér. V rámci šetrenia sa nebudú zaraďovať nové jedince do skupín jednotlivých antigénov DB, ak zdravotný i kondičný stav umožní použiť overeného králika.

Zásada zjemnenia (refinement)

Nakoľko pri použití opakovanej dávky jednotlivých antigénov DB pre zvieratá v danej skupine sa jedná o dlhodobý projekt, v ktorom dobrý zdravotný stav a dobrá kondícia zvierat hrajú veľmi dôležitú úlohu, starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Králiky budú mať k dispozícii dostupné prostriedky zlepšujúce ich životné podmienky v projekte. Postupy používané pri aplikáciách i odberoch krvi majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú taktiež vykonávané skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Pri výskyte bolestivých stavov sa postihnutému jedincovi podá prostriedok na zníženie bolesti (Novasul, 0,1 ml/kg, i.m.). Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokéj celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

3629/18-221

Cieľ projektu

Tréning zručností lekárov v predatestačnej príprave v mikrochirurgických technikách. Cieľom praktického kurzu je osvojiť si základné mikrovaskulárne techniky v laboratórnych podmienkach, čo je kľúčové pre klinickú prax.

OČAKÁVANÝ PRÍNOS

Rekonštrukčné operačné výkony v oblasti hlavy a krku sú komplexnou a technicky náročnou chirurgickou disciplínou. Mikrovaskulárne prenosy voľných lalokov sú neoddeliteľnou súčasťou rekonštrukčných operácií v oblasti hlavy a krku. Prínosom bude zvýšenie úrovne vedomostí lekárov, ktorí následne uplatnia tieto techniky u ľudí.

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie bez možnosti zotavenia. Pri týchto postupoch budú zvieratá pociťovať iba jednorazovo slabú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat. Počas invazívnych výkonov budú zvieratá uspaté na zabránenie vzniku bolesti a následne utrpenia. Z anestézie sa už nepreberú a budú humánne utratené

Počet a typ zvierat

Druh použitých zvierat je *rattus norvegicus*, kmeňa Wistar, celkovo 30 samcov

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Nahradenie

Potkany sú optimálne zvieratá na nácvik mikrochirurgických techník. Na jednej strane sú dostatočne malé, na strane druhej dostatočne veľké. Myši by v tomto prípade boli príliš malé. V rámci kurzu sú prvé dva dni s nácvikom na trenažéri jednoduchých mikrochirurgických anastomóz. To samo osebe znižuje počet potrebných zvierat o 20 (10 účastníkov, 2 dni). Pokročilejšie metódy žiaľ nie je možné ale nacvičovať na trenažéroch, nakoľko ide o komplikovanejšie techniky rekonštrukčnej chirurgie – prenos lalokov.

Obmedzenie

Počet zvierat je minimálny na tri dni nácviku pre 10 účastníkov. Jedno zviera nie je možné využiť opakovane v rámci dní, nakoľko ide o projekt bez možnosti zotavenia. V rámci jedného dňa sa na zvieratách vyskúša niekoľko techník – end-to-end; end-to-side, side-to-side mikroanastomózy ako i prenos mikrovaskulárnych lalokov.

Zjemnenie

Zvieratá budú počas operácie v hlbokoj chirurgickej anestézii, pričom sa im podľa potreby budú aplikovať ďalšie dávky, tak aby táto hlboká anestézia bola zachovaná po celý čas. Následne po skončení, sa zvieratá dopichnú do štádia IV anestézie a následne sa cervikálne dislokujú. Počas karanténnej fázy sa so zvieratami sa bude manipulovať jemne, budú mať prístup k vode aj potrave ad libitum, v klietkach sú dostupné hračky.

Spätné posúdenie

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

Príloha č.2: Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: NutriAging: Výživa a zdravé starnutie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: MPRV-2017-2510/10246-12 3665/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): starnutie, vitamín D, proteíny, omega-3 mastné kyseliny, cvičenie

Účel projektu:

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

Ciele projektu:

Cieľom projektu je štúdium účinkov vybraných živín (vitamín D, omega-3 mastné kyseliny, bielkoviny) a cvičenia na molekulárne mechanizmy straty svalovej hmoty a zhoršenie kognitívnych funkcií, ktoré sprevádzajú starnutie laboratórnych potkanov. Podrobná analýza krvných vzoriek a orgánov nám pomôže objasniť mechanizmy sarkopénie na úrovni tkanív, orgánov, aj celého organizmu a ako sú tieto mechanizmy ovplyvňované vybranými živinami a cvičením. Výsledky analýz budú korelované s funkčnými parametrami sarkopénie (hmotnosť svalov, dĺžka kroku, rýchlosť chôdze) a s výsledkami kognitívneho testu zameraného na charakteristiky odhaľujúce poruchy pamäte a schopnosť učiť sa.

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

Poznatky o molekulových mechanizmoch, ktoré sa uplatňujú v patofyziológii starnutia, ako aj poznatky o účinkoch vybraných živín (proteíny, vitamín D, omega-3 MK) a cvičenia na tieto mechanizmy môžu prispieť k predĺženiu zdravého starnutia a zlepšeniu kvality života vo vyššom veku.

Riešenie projektu prispeje:

- k rozšíreniu poznatkov o molekulových mechanizmoch uplatňujúcich sa v patofyziológii sarkopénie a neurodegeneratívnych ochorení
- k rozšíreniu poznatkov o účinkoch vybraných živín (proteíny, vitamín D, omega-3 MK) a cvičenia na molekulové mechanizmy uplatňujúce sa v patofyziológii sarkopénie a neurodegeneratívnych ochorení
- k poznaniu, či príjem vybraných živín spolu s cvičením ovplyvňujú vznik a progresiu sarkopénie a neurodegeneratívnych ochorení, čo by mohlo viesť k ich potenciálnemu využitiu u ľudí, predĺženiu zdravého starnutia a zlepšeniu kvality života vo vyššom veku

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Počas 3 rokov v troch experimentoch sa predpokladá použitie týchto zvierat:

potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), samec, kmeň: Wistar, 323 ks

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

Plánované experimentálne postupy nebudú mať výrazný nepriaznivý dopad na zdravotný stav zvierat. Zhoršený zdravotný stav bude podmienený zvyšujúcim sa vekom a rozvojom ochorení sprevádzajúcich starnutie. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a na plánované experimentálne procedúry budú privykané postupným tréningom (handling) tak, aby bol v čo najväčšej miere eliminovaný ich prípadný stres a utrpenie. Zodpovednosť za sledovanie zdravotného stavu zvierat bude mať ošetrovateľ a zodpovedný riešiteľ projektu. Pri uskutočňovaní plánovaných experimentálnych postupov budú zvieratá znášať len krátkodobý mierny diskomfort, a to najmä pri podávaní látok žalúdočnou sondou, pri realizácii kognitívneho testu a cvičenia. Projekt nepredpokladá výrazný nepriaznivý vplyv týchto postupov na zvieratá.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

<i>Úkon</i>	<i>opakovanie</i>	<i>kategória krutosti</i>
váženie	áno	slabá
Kognitívny test - test rozpoznávania objektov	nie	slabá
podávanie látok žalúdočnou sondou	áno	stredná
cvičenie	áno	stredná
stav zvierat		slabá
1. 9-10 mesiacov staré		slabá
2. 19-20 mesiacov staré		slabá
3. 23-24 mesiacov staré		slabá

Humane endpoints nastane v prípade súčasnej prítomnosti viac ako 5 prejavov zhoršeného zdravotného stavu t.j. malátnosti, dehydratácie, stratou elasticity kože, naježením srsti, zmenšením orbitálnych oblúkov, neschopnosťou natiahnuť sa za vodou a potravou a stratou hmotnosti o 20 %. Zvieratá, ktoré dosiahnu hodnotiace skóre 5 budú pod dohľadom veterinárneho lekára humánne usmrtené.

Hodnotiace skóre zdravotného stavu zvierat

<i>Bodové skóre</i>	<i>Charakter zdravotného stavu</i>	<i>Opatrenie</i>
0	Fyziologický zdravotný stav	
1	Dobrý zdravotný stav	
2	Mierne zhoršený zdravotný stav	zváženie doplnkovej starostlivosti, častejšia kontrola zvierat'a

3	Zhoršený zdravotný stav	Prítomnosť 3 prejavov zhoršeného zdravotného stavu častejšia kontrola zvierat'a, doplňková starostlivosť (analgetiká, prídanie tekutín, zvýšenie tepla)
4	Zlý zdravotný stav	Prítomnosť 4 prejavov zhoršeného zdravotného stavu porada s veterinárom
5	Nepriaznivý zdravotný stav	Prítomnosť 5 prejavov zhoršeného zdravotného stavu (humane endpoint) vyradenie zvierat'a z postupu

Sledované parametre v hodnotiacom procese:

- celkový *vzhľad zvierat'a*:

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

- *telesné funkcie zvierat'a*:

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

- *sociálne interakcie zvierat'a*:

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

- *chovné prostredie*:

- znečistenie podstielky, stolica a jej hustota, prítomnosť vývratkov, krvi, používanie pomôcok na obohatenie prostredia

- *voľné pozorovania*:

- iné neobvyklé pozorovania, znaky bolesti a utrpenia - výraz tváre (nos, uši, fúzy)

Uplatňovanie zásad 3R:

1. Nahradenie zvierat (replacement)

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

2. Redukcia počtu zvierat (reduction)

V plánovanom experimente je uvažované s minimálnym počtom zvierat. Počet zvierat bol posudzovaný z hľadiska zabezpečenia cieľov projektu, patológie ochorenia, množstva

potrebného biologického materiálu pre plánovaný objem analýz, štatistického vyhodnotenia, validity a reprodukovateľnosti výsledkov.

3. Zjemnenie (refinement)

Zvieratám budú zabezpečené dobré životné podmienky, budú ošetrované skúsenými zaškolenými pracovníkmi a budú pod dohľadom veterinárneho lekára. Zvieratá budú mať neobmedzený prístup k potrave a vode. Pri manipulácii sa bude so zvieratami zaobchádzať šetrne a ohľaduplne, aby si zvykli na manipuláciu a minimalizoval sa stres. Pri cvičení sa bude využívať spontánna aktivita zvierat, takže nedôjde k vyčerpaniu zvierat'a. V prípade kognitívneho testu zvieratá budú postupne trénované na danú testovaciu situáciu a test bude vykonávaný v limitovanom časovom intervale, aby nedošlo k vyčerpaniu zvierat'a. Životné prostredie zvierat bude obohatené pomocou dostupných zjemňovacích techník, materiálom na stavanie hniezd, hru a zvieratá budú žiť v sociálne známych skupinách. V prípade zhoršeného zdravotného stavu sa podľa potreby zvýši teplota prostredia, príp. sa použijú vyhrievacie podložky, pridá sa stelivo, zvieratám môže byť poskytnutá nasiaknutá potrava, ktorá bude umiestnená na podlahe chovnej klieťky, kocky s tekutinou a podobne. V prípade dlhotrvajúcej strednej bolesti alebo krutej bolesti zviera bude vyradené z projektu a usmrtené na podklade hodnotiaceho skóre a humane end- points (nechutenstvo - neprijímanie potravy a vody, náhla strata váhy >20 %, namáhavé dýchanie, zovreté brucho, dehydratácia > 48 hod, hnačka). Zvieratá vyradené z projektu budú humánne usmrtené použitím nadmernej dávky inhalačného anestetika Sevofluranu. Po skončení projektu budú získané skúsenosti a poznatky použité na zjemnenie utrpenia zvierat v prípadných ďalších animálnych experimentoch. Usmrtenie zvierat na konci experimentu bude vykonané odberom krvi z abdominálnej aorty v bezvedomí po použití celkovej inhalačnej anestézie Sevofluranom.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Ionizujúcim žiarením indukované metabolické, histologické a funkčné zmeny v mozgu a mieche za experimentálnych podmienok.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3683/18-221/3

Kľúčové slová v projekte: frakcionované ožiarenie, mozog, miecha, ¹HMRs, behaviorálne testy, imunohistochemické farbenie

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

Informácie o cieľoch projektu

V experimentoch sa zameriame na indukciu radiačného poškodenia špecifických neurogénnych oblastí v mozgu potkanov a radiačné poškodenie miechy a pomocou vybraných markerov budeme detailnejšie sledovať apoptotické prejavy, zmeny mitotickej aktivity a ďalšie parametre zapojené do regulácie bunkového cyklu. Rovnako sa budeme snažiť určiť pomocou behaviorálnych testov aj k akým zmenám krátkodobej a dlhodobej priestorovej pamäte dochádza po aplikácii frakcionovaných dávok ionizujúceho žiarenia. Budeme snažiť objasniť a pochopiť patogenézu vzniku niektorých žiarením indukovaných histopatologických reverzibilných a ireverzibilných zmien v mozgu a mieche potkanov. Získané údaje sa môžu využiť pri prevencii a objasnení patogenézy vzniku neskorých ireverzibilných komplikácií v klinickej rádioterapii. Získané výsledky ponúkneme do diskusie s rádioterapeutickými odborníkmi pre ich prípadné využitie v každodennej klinickej praxi.

Predpokladaný prínos projektu

Výsledky našej práce môžu pomôcť objasniť príčiny a dôsledky morfológických a funkčných zmien, ktoré sa vyskytujú v klinickej rádioterapii nádorov hlavy a krku. V klinickej praxi sú terapeutickou dávkou žiarenia zasiahnuté aj tkanivá v okolí nádorového infiltrátu, z dôvodu prítomnosti mikrometastáz, ktoré sa stávajú zdrojom rýchlej recidívy pôvodného nádoru. Je dôležité zistiť, či v zdravom tkanive zasiahnutom tak vysokými dávkami žiarenia nastávajú reverzibilné zmeny a známky reparačných procesov alebo sú nezvratné. To je dôležité najmä z hľadiska neurologického stavu a kvality života pacienta. Medián prežívania pacientov po rádioterapii niektorých nádorov hlavy a krku je krátky. Existuje len veľmi málo experimentálnych štúdií zaoberajúcich sa vplyvom frakcionovaného ionizujúceho žiarenia na miechu. Z tohto aj etického hľadiska je obtiažne skúmať neskoré postradiačné zmeny u pacientov. Neurogénne oblasti v mozgu experimentálnych potkanov sú pre tento účel veľmi vhodnou oblasťou, keďže sa vyznačujú určitou mitotickou aktivitou, aj keď nie príliš výraznou, takže rádiosenzitivita je vyššia ako v okolitom tkanive. Preto môže poslúžiť ako modelová oblasť pre náš výskum.

Počet a druh zvierat: Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus* var. alba) kmeň Wistar, samec, 60 jedincov

Predpokladaná doba riešenia projektu:

Predpokladaná doba riešenia projektu – **2 roky (1.2.2019-31.12.2020)**, počas ktorých uskutočníme **60 čiastkových pokusov**, pričom v každom použijeme iba **jedno zviera (Potkan laboratórny)**.

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

V projekte očakávame žiarením indukované metabolické, histopatologické a funkčné zmeny. Skúsenosti z našich predchádzajúcich štúdií uvádzajú výraznejšie histopatologické zmeny v nervovom tkanive po aplikovaní jednorazovej dávky žiarenia. To môže viesť až k prejavom radiačnej nekrózy nervového tkaniva s dopadom na metabolizmus (zníženie telesnej hmotnosti, chradnutie) a kognitívne zmeny (poškodenie krátkodobej a dlhodobej pamäte). V našom experimente celkovú dávku rozdelíme na viaceré menšie frakcie. Tento model je bežne používaný v klinickej rádioterapii, pretože frakcionované ožiarenie je šetrnejšie k tkanivu ako jednorazová expozícia. Z dlhodobých zmien, ktoré môžu nastať po frakcionovanom ožiarení mozgu a miechy sa dajú makroskopicky pozorovať mierna až stredná strata hmotnosti, apatia, spavosť a menšia pohyblivosť. Ďalšie zmeny sa bežným pozorovaním nedajú identifikovať (pokles pamäťových schopností identifikovaný pomocou behaviorálnych testov), avšak podľa našich skúseností zásadne neznižujú komfort zvierat počas doby trvania experimentu. Z týchto dôvodov spôsobená ujma na zvieratách je menšia ako predpokladaný prínos projektu.

Klasifikácia krutosti postupov

Prehľad plánovaných postupov spolu s očakávanými zdravotnými zmenami a kategóriou krutosti.

postup	charakter strachu, bolesti alebo utrpenia	kategória krutosti
váženie telesnej hmotnosti	Krátkodobé obmedzenie pohybu zvierat, ktoré im spôsobí krátkodobé a slabé narušenie pohody.	slabá
podávanie anestézy so zotavením	Celková anestéza pred procedúrou ožarovania, pred neinvazívnym vyšetrením ¹ H MRS a pred celotelovou perfúziou. Zviera v priebehu niekoľkých minút stratí vedomie a uvedie sa do spánku.	slabá
neinvazívne in vivo zobrazovanie pomocou ¹ H MRS	Zvieratá sú v celkovej anestéze a spôsobí im to slabú bolesť.	slabá
behaviorálne testy	U zvierat sa počas behaviorálneho testovania vyvolajú únikové a vyhýbavé reakcie, pri ktorých nemôžu uniknúť pred stimulom, alebo sa mu vyhnúť. Očakáva sa, že zvieratám spôsobí stredný strach.	stredná
ožarovanie	Zvieratá sú ožiarené subletálnou alebo vyššou dávkou, pričom jedno ožarovanie bude trvať asi 20 minút. Obnovenie imunitného systému s očakávanými strednými a krátkodobými účinkami by malo trvať 5 dní.	stredná
účinky po ožiarení (bezprostredne po aplikovaní jednotlivých frakcií žiarenia)	Makroskopicky možno pozorovať apatiu a spavosť. Účinky po ožiarení by mali slabé, stredné a krátkodobé.	stredná

účinky po ožiarení (po skončení ožarovacej schémy a počas prežívania po ožiarení)	Makroskopicky možno pozorovať miernu až strednú stratu hmotnosti, apatiu, spavosť a menšiu pohyblivosť. Zvieratá môžu pociťovať dlhotrvajúcu slabú bolesť alebo krátkodobú strednú bolesť.	stredná
celotelová perfúzia	Celotelová transkardiálna perfúzia v celkovej anestéze pomocou fyziologického roztoku a následne fixačným roztokom 4% paraformaldehydu je pre zvieratá letálna.	slabá

Celková krutosť postupov počas týchto úkonov a vyšetrení: „**stredná**“.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Charakter nášho projektu nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validitný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami.

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované a prezentované na mnohých odborných fórach doma aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce s pokusnými zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky, či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov.

Postupy projektu sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej rádioterapii. Považujeme preto nami navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

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

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

Zjemnenie (Refinement): Spôsob manipulácie so zvieratami a starostlivosť o zvieratá počas postupu bude v súlade s požiadavkami uvedenými v *Nariadení vlády SR č. 377/2012 Z.z.* a *Vyhláske Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR č. 436/2012 Z.z.*

Všetky postupy na zvieratách (ožarovanie, ¹H MRS, celotelová perfúzia) budú vykonávané v celkovej anestéze (Zoletil 0,2–0,4mg/kg, i.m. a xylazín s.c. 0,1–0,2ml/kg hm., s.c.) alebo kombináciou 6% a potom 3,5–4,5% sevoflurán a O₂ alebo 4% a potom 1,5–2,5% Izoflurán a O₂. Po skončení anestézy bude zvieratám venovaná štandardná starostlivosť resp. po skončení perfúzie budú bez možnosti zotavenia. Stav všetkých zvierat v postupe bude pravidelne monitorovaný vedúcim projektu alebo inou poverenou, odborne spôsobilou osobou. Za účelom obmedzenia, zabránenia a zmiernenia akejkoľvek formy utrpenia zvierat a použijeme stupnicu hodnotenia welfare zvierat. V prípade zhoršenia zdravotného stavu zvierat sa bude postupovať podľa hodnoty celkového human end-point skóre.

Zníženie (Reduction): Na získanie platných výsledkov použijeme 10 zvierat v každej ožiarenej skupine a 10 zvierat v kontrolnej skupine, čo považujeme za najnižší možný počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj z hľadiska získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Pre vysvetlenie, rovnaká skupina zvierat postupne absolvuje všetky popísané postupy (ožarovanie, ¹H MRS, behaviorálne testy, vyšetrenie

plazmy a histologické vyšetrenie). Menší počet zvierat by mohol spôsobiť výraznejšie pôsobenie inter-individuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov. **Nahradenie (Replacement):** Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Pri takto plánovanom projekte nie je možné použiť nižší živočíšny druh. Z anatomických a kapacitných dôvodov (viac problémov s anestézou, ťažko vykonateľná správna perfúzia, použitie väčšieho počtu zvierat) a optimálnej výťažnosti výsledkov by bolo pre nás z veľmi obtiažne previesť pokus na nižšom živočíšnom druhu. Vzhľadom na protokol postupov projektu je Potkan laboratórny najvhodnejším živočíšnym druhom použiteľným v našich podmienkach.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

3695/18-221

Názov projektu: Analýza neneuronálneho cholinergického systému u normotenzných a hypertenzných potkanov

Kľúčové slová: neneuronálny cholinergický systém, cievy, potkan, hypertenzia

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Keďže prakticky kompletne absentujú poznatky týkajúce sa distribúcie génovej expresie a aktivity enzýmov pre syntézu, degradáciu a transport ACh v endoteli, resp. hladkom svale ciev, v projekte sa plánujeme nimi podrobne zaoberať s využitím metód molekulovej biológie, biochémie, enzymológie, imunohistochemie, ako aj metód používaných pri štúdiu funkčného stavu ciev a analýze krvného tlaku.

Prínos z vykonaného projektu:

Poznatky o prítomnosti, lokalizácii a funkcii komponentov neneuronálneho cholinergického systému v cievach u zdravých a hypertenzných jedincov by mohli prispieť k objasneniu ich fyziologickej funkcie, čo obohatí poznatky vo fyziológii kardiovaskulárneho systému a prípadné rozdiely medzi normotenznými a hypertenznými jedincami môžu viesť k novým terapeutickým možnostiam v liečbe kardiovaskulárnych ochorení.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :

Potkany, samce rodu Wistar 48 ks, samce rodu SHR 48 ks

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

Zvieratám bude meraný krvný tlak pomocou tail-cuff metódy. Toto zahŕňa krátkodobé obmedzenie pohybu a nahriatie na 37 °C počas približne 10-15 minút. Zvieratám nebude spôsobovaná bolesť. Utratenie zvierat bude prebiehať v CO₂ atmosfére, zvieratá rýchlo stratia vedomie.

Predpokladaná úroveň krutosti:

váženie zvierat – slabá

meranie krvného tlaku a tepovej frekvencie pomocou tail-cuff metódy - slabá

Uplatňovanie zásad 3R

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Zvieratá, ktoré budú použité vo fáze 1 na analýzu distribúcie génovej expresie v rámci cievnej steny, vo fáze 2 na analýzu rozdielov v expresii markerov medzi jednotlivými časťami aorty, vo fáze 3 na funkčné štúdie na izolovanej aorte, ako aj vo fáze 4 na mikroskopické imunofluorescenčné a aktivitné štúdie v rezoch aorty musia byť odlišné, t.j., zvieratá z ktorejkoľvek fázy nemôžu byť použité v inej.

Refinement

Budú vykonané opatrenia –handling na zníženie stresu pri meraní krvného tlaku tail-cuff metódou. Zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým.

1. Nahradenie:

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť krvný tlak, tepová frekvencia, distribúcia génovej expresie z intaktnej cievy, aktivitné farbenia pre lokalizáciu enzýmov v cievnej stene, funkcia endotelu na izolovanej cieve, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako *in vitro* pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť distribúciu génovej expresie ani aktivitu enzýmov tak ako v rezoch intaktnej cievy. Fenotyp bunkových kultúr sa môže výrazne líšiť od fenotypu zodpovedajúcich buniek v intaktnej cieve. Rovnako nemožno hodnotiť komplexné deje, akými je odpoveď izolovanej cievy na vazokonstrikčné a vazodilatačné stimuly *ex vivo*.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Zvieratá, ktoré budú použité vo fáze 1 na analýzu distribúcie génovej expresie v rámci cievnej steny, vo fáze 2 na analýzu rozdielov v expresii markerov medzi jednotlivými časťami aorty, vo fáze 3 na funkčné štúdie na izolovanej aorte, ako aj vo fáze 4 na mikroskopické imunofluorescenčné a aktivitné štúdie v rezoch aorty musia byť odlišné, t.j., nemožno zvieratá z ktorejkoľvek fázy použiť v inej.

3. Zjemnenie:

Budú vykonané opatrenia –handling na zníženie stresu pri meraní krvného tlaku tail-cuff metódou. Zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým.

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

3694/18-221/3

Názov projektu: Funkčná architektúra neuronálnych obvodov pri neurodegenerácii**Kľúčové slová v projekte:** neurodegenerácia, neuronálne obvody, in-vivo, hlodavce**Účel projektu:** Základný výskum**Podrobný účel postupu**

Alzheimerova choroba a príbuzné neurodegeneratívne ochorenia sa spájajú s akumuláciou abnormálnej formy proteínov v mozgu, čo spôsobuje degeneráciu a dysfunkciu neurónov, ktorá následne vedie k charakteristickým kognitívnym zmenám. Akým spôsobom molekulárne zmeny ovplyvňujú spracovávanie informácií v mozgu a postupne vedú ku kognitívnym zmenám pri Alzheimerovej chorobe, je neznáme. Projekt si kladie za svoj cieľ zmapovať funkčnú architektúru mozgových štruktúr postihnutých neurodegeneráciou pomocou kombinácie moderných elektrofyziológických, zobrazovacích, optogenetických a behaviorálnych techník. Na experimenty sa budú používať laboratórne hlodavce, ktoré budú mať definované typy mozgových buniek označené pomocou fluorescenčných proteínov. Morfológia a aktivita neurónov sa bude zaznamenávať pomocou zobrazovacích a elektrofyziológických postupov.

Prínos z vykonaného projektu

Výsledky navrhnutých experimentov prispievajú k objasneniu spracovania informácií v mozgu, identifikácii funkcie presne definovaných častí neuronálnych obvodov mozgu a vzťahu medzi mozgovou aktivitou a kognitívnymi procesmi v mozgu hlodavcov, ako aj mozgu ľudí. Výsledky však predovšetkým môžu viesť k presnej charakterizácii patogenézy neurodegeneratívnych ochorení a následnej identifikácii nových terapeutických, príp. diagnostických cieľov pri Alzheimerovej chorobe.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Mozog hlodavcov predstavuje nenahraditeľný systém, ktorý umožňuje sledovať reálne procesy spracovávania informácií mozgovým tkanivom, ktoré sú blízke procesom spracovávania informácií ľudským mozgom. Práve hlodavce nám umožňujú pochopiť zmeny fungovania mozgu v priebehu (neurodegeneratívnych) chorôb. U hlodavcov môžu byť označené presne definované typy neuronálnych sietí, čo umožňuje detailné štúdium aktivity a predovšetkým *funkcie* štruktúr v živom mozgu. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty

Predpokladané približné počty zvierat na plánované 4 roky projektu:

Potkan laboratórny (samička, samec) 200

Transgénna myš (samička, samec) 400

Myš laboratórna (samička, samec) 400

Väčšina experimentálnych zvierat v projekte budú geneticky modifikované zvieratá.

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

Všetky operačné zákroky sa uskutočnia v hlbokoj anestézii a po ukončení pokusov budú zvieratá humánne usmrtené. Všetky navrhované experimentálne postupy používajú štandardné zavedené techniky, ktoré minimalizujú nepriaznivý dopad na experimentálne zvieratá. V priebehu pooperačnej starostlivosti budú zvieratám podávané analgetiká a antibiotiká pre zabránenie bolesti a infekcii. Počas obdobia prežívania budú zvieratá denne kontrolované a podľa potreby im budú podávané analgetiká a antibiotiká. V priebehu behaviorálnych pokusov budú zvieratá denne monitorované a budú mať zabezpečený kontrolovaný prísun tekutín pre minimalizáciu stresu spôsobeného zníženým prísunom vody. Zvieratá pripravované na experimenty s upevnenou hlavou (imobilizované) budú dôsledne handlované, trénované a monitorované, aby sa minimalizoval stres v priebehu tréningu a experimentu.

Manipulácia so zvieratami

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Vázenie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a i.p. injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.

Príloha 2: Netechnické zhrnutie

Operačný zákrok	Štandardná metóda. Operácia vykonaná v celkovej inhalačnej anestézii. Trvanie 20-60 minút.
Stereotaxická aplikácia AAV	Štandardná metóda. AAV aplikované v celkovej anestézii do cieľovej oblasti mozgu. Trvanie 1-60 minút.
Pooperačná starostlivosť	Štandardná metóda. Možná slabá pooperačná bolesť. Kontrolované podávanie analgetík a antibiotík. Dôsledné monitorovanie zdravotného stavu zvierat a stavu implantátov.
Trénovanie na behaviorálne pokusy	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený <i>kontrolovanou miernou</i> vodnou depriváciou u vybraných typov behaviorálnych pokusov pri imobilizovaných alebo voľne sa pohybujúcich hlodavcoch.
Behaviorálne testy open-field, novel object recognition, y-maze	Štandardná metóda. Trvanie 20-60 min. Bolesť slabá u zvierat, ktoré podstúpili minimálne invazívny operačný zákrok. Bolesť žiadna u zvierat, ktoré nepodstúpili žiaden operačný zákrok.
Behaviorálne testy go/no-go u imobilizovaných hlodavcov	Štandardná metóda. Trvanie 20-60 min. Krátkodobý mierny stres spôsobený <i>kontrolovanou miernou</i> vodnou depriváciou a pripájaním na experimentálnu aparatúru.
Behaviorálne testy 2AFC u voľne sa pohybujúcich zvierat	Štandardná metóda. Trvanie 20-60 min. Krátkodobý mierny stres spôsobený <i>kontrolovanou miernou</i> vodnou depriváciou.
Zaznamenávanie neuronálnej morfológie a/alebo aktivity in-vivo <i>akútny experiment</i>	Štandardné metódy (zobrazovanie, patch-clamp, extracelulárna elektrofyziológia a ich kombinácie). Zvieratá sú počas akútnych pokusov v celkovej anestézii. Trvanie 1-8 hod.
Zaznamenávanie neuronálnej morfológie a/alebo aktivity in-vivo <i>chronický experiment</i>	Štandardné metódy a ich kombinácie. Chronické pokusy budú vykonávané štandardnými metódami určenými pre prácu s imobilizovanými hlodavcami. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatúry. Trvanie 1-2 hod.
Zaznamenávanie neuronálnej morfológie a/alebo aktivity počas behaviorálnych pokusov	Štandardné metódy a ich kombinácie. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a cca 20s imobilizáciou pri pripájaní aparatúry. Pokusy budú vykonávané štandardnými metódami určenými pre prácu s trénovanými imobilizovanými alebo voľne sa pohybujúcimi hlodavcami. Trvanie 1-2 hod.
Stav zvierat počas obdobia prežívania	Zvieratá reagujú veľmi dobre na implantáty, behaviorálne trénovanie a zaznamenávanie dát. Predpokladaná doba prežívania zvierat v pokuse je max. 3 mesiace. Bolesť slabá až stredná.
Transkardiálna perfúzia	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom.

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa dodržiavajú interné štandardné pracovné postupy. So zvieratami sa zaobchádza humánne a nevyvíja sa im prebytočný stres, ktorý nežiadúco ovplyvňuje experiment. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociálnym potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. V zverinci je denne monitorovaný a hodnotený 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 zvierat. U vybraných zvierat bude patológia indukovaná iba v cieľovej oblasti mozgu pomocou aplikácie AAV.

Redukcia: V navrhovaných experimentoch budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Cieľená expresia proteínov pomocou AAV bude použitá k tvorbe limitovaného množstva cielene vytvorených animálnych modelov, čo povedie k redukcii množstva použitých zvierat. Transgénne hlodavce budú krížené iba v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov. Navrhované počty zvierat sú nevyhnutné pre spoľahlivé štatistické vyhodnotenie výsledkov a predstavujú predpokladané maximálne počty; po získaní dostatočného množstva dát nebudú zvyšné zvieratá použité.

Nahradenie: Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo živého mozgového tkaniva hlodavcov za poznatky pochádzajúce z in-vitro experimentov. Detailný výskum mechanizmov spracovania a šírenia informácií v neurónových sieťach mozgu s využitím moderných postupov vyžadujúcich priamu manipuláciu s bunkami mozgu je možné uskutočňovať iba na pokusných zvieratách.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

V medzinárodných registroch alternatívnych metód sme nenašli žiadnu vhodnú metódu, ktorú by sme mohli použiť v projekte tak, aby sme nemuseli vykonávať experimenty na laboratórnych hlodavcoch. Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívne účinku.

Utrpenie versus prínos

Animálne modely Alzheimerovej choroby poskytujú možnosť použitia najmodernejších postupov označovania a manipulácie aktivity definovaných skupín neurónov. Mechanizmy spracovania informácií v mozgu sú podobné u väčšiny cicavcov a údaje zistené u laboratórnych zvierat je možné aplikovať na človeka a využiť ich pri vývoji nových diagnostických a terapeutických techník.

Zvieratá v navrhovaných experimentoch nebudú vystavené utrpeniu ani nadmernému stresu, všetky operačné zákroky sa uskutočnia v hlbkej anestézii, po prebratí sa z anestézie budú zvieratám podávané analgetiká a antibiotiká. Po ukončení pokusov budú zvieratá humanne usmrtené.

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

Začiatok pokusu je plánovaný na 01.01.2019 a bude sa realizovať počas nasledujúcich štyroch rokov, do 31.12.2022.

Spätné posúdenie 31.03.2023

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

podľa § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

3853/18-221/3

Názov projektu:

VPLYV FRUKTÓZOVEJ DIÉTY V EXPERIMENTÁLNYCH MODELOCH METABOLICKÉHO SYNDRÓMU A U ZDRAVÝCH JEDINCOV: NÁVRH ÚČINNEJ FARMAKOLOGICKEJ LIEČBY

Kľúčové slová: metabolický syndróm, srdce, cievy, mozog, antioxidanty

Účel projektu: Základný výskum

a) Ciele projektu

Postup je zameraný na štúdium mechanizmov etiopatogenézy metabolického syndrómu (MS) s cieľom navrhnúť novú účinnú liečbu, ktorá ovplyvní vznik a vývoj rizikových faktorov kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení. Pre tento účel sa bude pracovať s viacerými animálnymi modelmi MS: hypertriglyceridemické (HTG) potkany, spontánne hypertenzné (SHR) potkany, Zucker obézne (ZO) a Zucker štíhle (ZL) potkany, ktoré budú kŕmené fruktózovou alebo štandardnou diétou v porovnaní so zdravými jedincami (potkany kmeňa Wistar). Metabolické poruchy sa v klinickom obraze týchto zvierat prejavujú hypertenziou, hypercholesterolémiou, hyperglykémiou, hypertriacylglycerolémiou, zápalovými reakciami a zvýšením hladín markerov oxidačného stresu. Po opakovanom 4-týždňovom podávaní pyridoinolu SMe1EC2, omega-3 mastných kyselín alebo kombinácie SMe1EC2 + omega-3 mastné kyseliny potkanom sa zistí účinok na viaceré rizikové faktory MS, stanoví sa funkčné, behaviorálne a histopatologické zmeny, lipidový profil krvného séra, zmeny markerov poškodenia na bunkovej a molekulárnej úrovni. Očakávaným **prínosom** bude originálny poznatok, že perspektívny antioxidant SMe1EC2, ktorý bol doteraz testovaný iba samostatne, účinnejšie ovplyvní po podaní v kombinácii s omega-3 mastnými kyselinami viaceré rizikové faktory kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení bez rizika zvýšenia nežiaducich účinkov u zvierat s MS.

Počet a druh použitých zvierat

- 1) Laboratórny potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň Wistar, samce, 140 jedincov
- 2) Laboratórny potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň SHR, samce, 140 jedincov
- 3) Laboratórny potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň HTG, samce, 140 jedincov
- 4) Laboratórny potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň Zucker obézne, samce, 140 jedincov
- 5) Laboratórny potkan (*Rattus norvegicus*), kmeň Zucker štíhle, samce, 140 ks jedincov

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávaného postupu

Počas postupu sa bude so zvieratami zaobchádzať šetrne v súlade so zásadami **3R** s minimálnou **ujmou** počas vystavenia fruktózovej diéte. Upravená strava nevyvoláva u zvierat diskomfort, vzhľadom na použitie relatívne miernej fruktózovej diéty (20%) trvajúcej 5 týždňov. Objavenie sa eventuálnych negatívnych prejavov bude do veľkej miery závisieť aj od individuálnej tolerancie fruktózy zvierat a je možný výskyt mäkkšej stolice u niektorých citlivých jedincov. Celkový zdravotný stav takýchto potkanov bude obzvlášť sledovaný podľa kritérií human end points, aby sa zabránilo bolesti a utrpeniu zvierat. Testované látky budú podávané na keksy, čo im nespôsobuje ujmu, naopak potkany si to rýchlo obľúbia. Odbere krvi z retroorbitálneho plexu v zoletil/xylazínovej narkóze nespôsobuje zvieratám ujmu, po prebratí sa z narkózy môžu zvieratá pociťovať mierny diskomfort, avšak z praxe vieme, že veľmi rýchlo regenerujú. V predchádzajúcich postupoch s vysokotukovou diétou počas 8 týždňov neboli zaznamenané žiadne komplikácie, ujma alebo úhyn zvierat a je predpoklad, že podobne fruktózová diéta nebude mať také následky, aby spôsobila

zvieratám ujmu. Pri behaviorálnych testoch NOR a v MWM sa bude postupovať podľa zaužívaných protokolov. NOR tst nemá zanedok žiadnu ujmu, nakoľko predstavuje pre zviera hru. MWM nemá za následok výraznú ujmu, nakoľko potkany rady plávajú, voda bude mať teplotu 24 °C a jednotlivé testovania majú krátke trvanie (max. 60s).

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

- Handling potkanov 10 min/5 ks-vanica/deň, t.j. navykanie zvierat na manipuláciu pred meraním tlaku krvi, potkany dobre znášajú handling - slabá krutosť
- Váženie zvierat 1x do týždňa, potkany dobre znášajú váženie - slabá krutosť
- Neinvazívne meranie tlaku krvi pred liečbou a na konci 4-týždňovej liečby, potkany dobre znášajú manipuláciu pri neinvazívnom meraní tlaku krvi manžetou na chvoste - slabá krutosť
- Odber krvi z retroorbitálneho plexu pred liečbou a na konci 4-týždňovej liečby, v anestézii (zoletil 25mg/kg + xylazín 16 mg/kg živej hmotnosti), potkany po prebratí z narkózy môžu pociťovať miernu bolesť po odbere krvi a budú pozorované aj na nasledujúci deň po odbere - stredná krutosť
- 5 týždňová diéta s pridaním fruktózy (20%) bez liečby, 20% fruktóza sa považuje za miernu diétu - slabá krutosť
- 5 týždňová diéta s pridaním fruktózy (20%) + od 2. týždňa postupu podávanie testovaných látok na keksík počas 4 týždňov 1x denne, potkany veľmi dobre znášajú konzumáciu testovaných látok na keksík - slabá krutosť
- Behaviorálny test rozpoznávania nových objektov (NOR, Novel object recognition) je založený na spontánnej tendencii hlodavcov stráviť viac času skúmaním nového objektu než známeho. Voľba preskúmať nový predmet odráža používanie pamäti, učenia a rozpoznávania. NOR sa použije na testovanie negatívneho vplyvu fruktózovej diéty na pamäť potkana. Potkan bude mať k dispozícii preskúmať dva podobné predmety. Po 6 hodinách bude mať k dispozícii preskúmať opäť dva predmety, pričom jeden z nich bude nový oproti prvému pozorovaniu. Hodnotiť sa bude čas strávený pri novom objekte. NOR sa bude testovať dvakrát: v 1. a 5. týždeň postupu - slabá krutosť
- Behaviorálny test v Morrisovom vodnom bludisku (MWM): 4 opakované testovania denne v MWM počas 4 po sebe idúcich dní, nultý deň na oboznámenie sa zvierat'a s lokalizáciou ostrovčeka; trvanie jedného merania v bazéne max. 60 s, potkany dobre znášajú plávanie, teplota vody v bazéne je 23 °C, testovanie sa opakuje denne 4x, po poslednom teste sú zvieratá jemne osušené bavlnenou handrou a dané pod infračervenú lampu a nakoniec vložené do domovskej klietky - stredná krutosť

b) Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zmenenia (3R)

Nahradenie (Replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná vedecky akceptovateľná alternatívna metóda na štúdium dyslipidémie, hypertenzie, zmenenej tepovej frekvencie, hyperglykémie a vplyvu na kognitívne schopnosti, ktorá by nahradila klasický in vivo prístup na zvieratách. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako in vitro pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť distribúciu génovej expresie ani aktivitu enzýmov tak ako v rezoch intaktnej cievy. Rovnako nie je možné zhodnotiť komplexné deje akými sú poruchy činnosti srdca, ciev a mozgu v dôsledku MS, ani vplyv testovaných látok na vyššie uvedené parametre nie je možné dosiahnuť bez použitia zvierat a testovania na celistvom organizme.

Obmedzenie (Reduction)

Na dosiahnutie cieľov projektu sa plánuje použiť najnižší možný počet zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Preto je potrebné v experimentoch použiť v jednotlivých skupinách 10 ks zvierat. Pri testovaní porúch činnosti srdca metódou podľa Langendorffa, nie je možné tieto srdcia použiť pre histologické a biochemické stanovenia a preto je potrebné mať tieto skupiny dve. Počas plánovaného obdobia sa za 4 roky predpokladá použitie 700 ks zvierat, z toho 140 ks kmeňa Wistar, 140 ks SHR, 140 ks HTG, 140 ks Zucker obéznych a 140 ks Zucker štíhlych potkanov.

Zjemnenie (Refinement)

Starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom pracovníkov zodpovedných za projekt. Pri všetkých postupoch sa bude manipulovať so zvieratami ohľaduplne, pred meraním tlaku krvi budú niekoľko dní vopred handlované aby kľudne znášali neinvazívne meranie, pripodávaní testovaných látok sme zvolili šetrnejšiu formu - podávanie na keksí oproti predtým používanej forme podávania gastrickou sondou, pri meraní vo vodnom bludisku bude voda vlažná 23 °C, po ukončení testu budú zvieratá jemne osušené bavlnenou handrou a dané pod infračervenú lampu a nakoniec vložené do domovskej klietky V prípade zhoršenia zdravotného stavu sa potkany v postupe humánne usmrtia predčasne ak by vykazovali príznaky ochorenia uvedené v human endpoints, ktoré by po spočítaní predstavovali hodnotu vyššiu ako 50%, aby sa zabránilo ich utrpeniu a bolesti.

Postupy používané pri odberoch krvi majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú vykonávané skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Budú vykonané opatrenia – handling zvierat na zníženie stresu pri meraní krvného tlaku neinvazívnou tail-cuff metódou. Fruktózová diéta počas 5 týždňov je pre potkany chuťovo prijateľná. Testované látky sú netoxické. Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody, klietky budú obohatené o plastové tunely umožňujúce preliezanie a hru. Počas celého postupu sa so zvieratami manipuluje jemne, aby nepociťovali strach alebo bolesť. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu by sa potkanom podalo napr. registrované analgetikum Novasul (500mg/ml; max. 0,1 ml/ 450g potkan),

Nevyžaduje sa opätovné posúdenie projektu.