

AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

po spojitom posúdení

Názov projektu:

Ethyl lactate Kombinovaná štúdia toxicity po opakovanom podaní so skriningovým testom reprodukčnej/vývojovej toxicity (OECD 422).

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-1976/18-221

Kľúčové slová v projekte:

Toxicita po opakovanom podaní, reprodukčná toxicita, REACH

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Cieľom projektu (štúdie) bolo poskytnúť podklady pre posúdenie bezpečnosti chemickej látky z hľadiska schopnosti vyvolať toxickú reakciu organizmu po opakovanom podaní látky a odhaliť potenciálne negatívne vplyvy na reprodukčné parametre podľa metódy OECD 422.

Prínos z vykonaného projektu:

Experiment poskytol v plnom rozsahu informácie, ktoré sú v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadované. Pokusná a pozorovacia stratégia boli jednoznačne dané metodikou OECD 422, ktorá je alternatívou pre testy Reprodukčnej skriningovej toxicity (OECD 421) a 28-dňovej toxicity (OECD 407) kde sa sledujú nielen reprodukčné parametre testovaných zvierat, ale robí sa aj hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, vyšetrenie moču, patológia a histopatológia.

Na základe výsledkov štúdie boli stanovené hodnoty NOAEL pre reprodukčnú a systémovú toxicitu.

Prínosom tejto štúdie bolo včasné rozpoznanie toxicity skúšanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

Druhy použitých zvierat a ich počty:

Bolo použitých 67 samcov a 77 samíc potkanov Wistar a narodilo sa 318 živých mláďat

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Bolo zabezpečené aby akékoľvek zhoršenie zdravotného stavu zvierat bolo konzultované s veterinárnym lekárom a tieto zvieratá v prípade ťažkých stavov by boli humánne utratené.

V pilotnom pokuse, v ktorom sa vyberali dávky pre hlavný pokus boli zaznamenané úhyny zvierat ako dôsledok podania testovanej látky. Keďže v štúdii s opakovaným podaním by minimálne jedna testovaná dávka mala spôsobiť toxické účinky aby sa dali indikovať potenciálne cieľové miesta pri intoxikácii, museli byť do pilotného pokusu zaradené aj dávky, ktoré sú letálne. Zaznamenané úhyny boli bez predchádzajúcich príznakov zhoršenia stavu.

Klinické príznaky pozorované pri nižších dávkach neboli dôvodom pre humánne usmrtenie nadmernou dávkou anestetika.

Klinické pozorovania počas prvého a druhého týždňa hlavného pokusu indikovali systémovú toxicitu u samíc najvyššej dávkovej skupiny. Dve samice zomreli spontánne. Prvá po 5-tich dávkach, druhá na 11. deň, pričom zhoršenie stavu bolo zaznamenané po 7-mich dávkach, ďalšie podávanie látky bolo z obavy ďalšieho zhoršenia stavu zastavené. Tretie zviera bolo humánne utratené predávkovaním anestetika vzhľadom na zhoršený zdravotný stav po 8-mich dňoch podávania testovanej látky. Od 10. dňa boli testované dávky vo všetkých skupinách redukované a až do konca experimentu boli podávané redukované dávky. Žiadne ďalšie úhyny alebo zhoršenie zdravotného stavu už neboli zaznamenané.

Úroveň krutosti:

Pokus bol pri plánovaní hodnotený ako stredne krutý až krutý vzhľadom na to, že išlo o doposiaľ netestovanú látku nedala sa vylúčiť systémová reakcia, ktorá by bola kategorizovaná ako krutá.

Vzhľadom na výsledky, experiment je možno vyhodnotiť ako krutý, vzhľadom na systémovú toxicitu pri najvyššej dávke, ktorá bola redukovaná aby bolo možné experiment ukončiť a zároveň naplniť ciele experimentu.

Uplatňovanie zásad 3R

V projekte boli zohľadňované zásady 3R. V pokuse neboli vykonané bolestivé zákroky, pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť.

Zvieratá boli v pokuse - časť „pretreatment“ (2 týždne) a „treatment“ (2 týždne) pred párením ustajnené skupinovo. Po párení boli samice, potenciálne matky, ustajnené v poslednom týždni gravidity (2 dni pred spontánnym pôrodom) individuálne. V tomto období bolo prostredie obohatené nerezovými nádobami, ktoré súžia zvieratám ako úkryt. Tieto sú inertné, bezpečné, dobre udržiavateľné a nehrozí ich poškodenie ani zo strany zvierat (neželaná expozícia, ktorá hrozí pri plastoch). V čase pred spontánnym pôrodom boli nádoby nahradené papierovou vatou na stavbu hniezda pre mláďatá.

Počty zvierat v pokuse boli primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu vychádzajúc z pravidiel OECD 422.

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu

po spôsobnom posúdení

Názov projektu: Modulácia mineralokortikoidných receptorov v prevencii negatívnych dôsledkov stresu na rozvoj karcinómu mliečnej žľazy.

Číslo rozhodnutia o schválení projektu: Ro 4178/17-221

Kľúčové slová: mineralokortikoidné receptory, karcinóm mliečnej žľazy, stres, MNU, eplerenón

Účel projektu:

základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

Cieľom projektu bola simulácia priebehu rakoviny prsníka, ktorý je spojený s intenzívnym stresom po stanovení diagnózy a následným chronickým stresom spojeným s priebehom a liečbou rakoviny. V animálnom modeli karcinómu mliečnej žľazy sme zisťovali vplyv modulácie mineralokortikoidných receptorov u kontrolných potkanov a potkanov vystavených stresu. Hlavným cieľom projektu bolo potvrdiť hypotézu, že blokáda mineralokortikoidných receptorov zmierni negatívne dôsledky stresu na rozvoj a priebeh rakoviny mliečnej žľazy u samíc potkanov. Predpokladali sme, že farmakologická blokáda mineralokortikoidných receptorov spomalí rast nádorov, zlepši prognózu a vyvolá pozitívne účinky na správanie.

Prínos projektu:

Jednalo sa o základný výskum, ktorého výsledky môžu byť následne využité v klinickej praxi. Antagonisty mineralokortikoidných receptorov sa využívajú v praxi v terapii kardiovaskulárnych ochorení. **Predbežne výsledky získané zatiaľ hodnotením jediného parametra, a to času makroskopického objavenia nádoru, ukazujú, že ovplyvnenie mineralokortikoidných receptorov nehrá dominantnú úlohu.** Predchádzajúce štúdie preukázali antidepresívne a anxiolytické účinky blokády mineralokortikoidných receptorov. **Rozšírili sme poznatky o účinkoch modulátorov mineralokortikoidných receptorov na percepciu stresu,** čo prispeje k novým možnostiam terapie negatívnych dôsledkov závažných somatických ochorení, akým je karcinóm prsnej žľazy.

Počet a druh použitých zvierat:

Sprague Dawley

Plánovaný počet 60 ks/skutočne použitý počet 60 ks.

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

V projekte sme simulovali priebeh ochorenia rakoviny prsníka spojený s chronickým prežívaním stresu, čo u experimentálnych zvierat nevyhnutne spôsobilo značnú ujmu. Bežná manipulácia, váženie a prehmatávanie nemalo na zvieratá nepriaznivý vplyv. Injekčné podanie chemikarcinogénu MNU 24 zvieratám v 2 dávkach použitím inzulínových striekačiek s tenkými ihlami vyvoláva iba krátkodobý diskomfort, preto bolo zaradené do kategórie strednej krutosti. Po aplikácii MNU 24 zvieratám sme sledovali vznik nádorov, ich veľkosť a tvar. Rast hmoty nádorov mliečnej žľazy postupne spôsoboval diskomfort pri pohybe zvierat. V neskorších štádiách progresie karcinómu spôsobovala palpácia miernu bolesť, čím sa zmenila skutočná úroveň krutosti zo slabej na strednú. Model chronického mierneho stresu predstavuje súbor nepredvídateľných podnetov mierneho charakteru, ktoré možno označiť ako stredne kruté. V experimente sme sledovali vplyv podávania eplerenónu v strave po dobu 6 týždňov. V tejto súvislosti sme tiež nepozorovali žiadny nepriaznivý vplyv/ujmu na zvieratách. Test otvoreného poľa mohol u zvierat vyvolať úzkosť a krátkodobý stres. V

případe testu sacharózovej preferencie nedošlo k žiadnej ujme. Zvieratá, ktorým bola podávaná strava s obsahom eplerenónu vykazovali podobnú rastovú krivku ako kontrolné zvieratá. Hodnotenie emočného stavu zvierat podľa Rat Grimace Scale preukázalo vyššiu mieru negatívnych príznakov u zvierat vystavených stresu a pozitívny účinok podávania eplerenónu na zvrátenie negatívnej emocionality.

Priradenie krutosti k jednotlivým postupom:

Postup	Krutosť v jednotlivých skupinách zvierat Predpokadaná/Skutočná				
	Absolútna kontrola (n=12)	MNU-kontrola (n=12)	MNU-kontrola-eplerenón (n=12)	MNU-stres (n=12)	MNU-stres-eplerenón (n=12)
Váženie	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá
Palpácia	slabá / slabá	slabá / stredná	slabá / stredná	slabá / stredná	slabá / stredná
Imobilizačný stres	-	-	-	krutá / krutá	krutá / krutá
Intraperitoneálna aplikácia MNU		stredná / stredná	stredná / stredná	stredná / stredná	stredná / stredná
Vznik a progresia karcinómu mliečnej žľazy	-	stredná / stredná	stredná / stredná	stredná / stredná	stredná / stredná
Chronický mierny stres	-	-	-	stredná / stredná	stredná / stredná
Podávanie liečiv v potrave	-	-	slabá / slabá	-	slabá / slabá
Test otvoreného poľa	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá
Test sacharózovej preferencie	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá	slabá / slabá
celková klasifikácia	slabá	stredná	stredná	krutá	krutá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie zvierat:

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nebolo možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Kmeň Sprague–Dawley podľa viacerých štúdií predstavuje najvhodnejší kmeň, u ktorého boli pozorované najvalidnejšie výsledky v nami plánovanom modeli ochorenia. Sledovali sa zmeny v neuroendokrinnom systéme, vplyv na správanie a preto bolo potrebné pracovať s potkanmi.

Redukcia počtu zvierat:

Počty zvierat boli stanovené z hľadiska reprodukovateľnosti a validity projektu. Znižovanie počtu mohlo ovplyvniť validitu dosiahnutých výsledkov. Počet zvierat pre účely projektu boli adekvátne. Počty v skupinách boli minimalizované tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené. Kvôli biologickej variabilite nádorov bolo v každej skupine použitých 12 zvierat.

Zjemnenie:

Zvieratá boli držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody (s výnimkou obdobia vykonávania postupov modelu chronického mierneho stresu). **Ďalšie zjemnenie sa dosiahlo poskytnutím väčšieho množstva podstielky a obohatením kliebok o boxy z tmavočerveného plexiskla. Výrazné zjemnenie predstavovalo vyhnutie sa opakovanému injekčnému podávaniu eplerenónu. Namiesto toho bolo liečivo zamiešané do stravy. Pre zjemnenie postupov sme tiež vystavovali zvieratá len skráteným behaviorálnym procedúram. Test sacharózovej preferencie sme vykonali bez predchádzajúcej deprivácie vody.** Na projekte sa podieľali len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Pre humánne ukončenie postupu bola stanovená strata hmotnosti prekračujúca viac ako 20%, prekročenie veľkosti nádoru 1,5 cm³, nádory vykazujúce ulceráciu, prípadne krvácanie. K humánnemu ukončeniu postupu došlo u dvoch zvierat.

Spätné posúdenie projektu:

K 30.12.2018 sme vykonali spätné posúdenie projektu. Konštatujeme, že postupy boli slabé pre 12 zvierat, stredne kruté pre 24 zvierat a kruté pre 24 zvierat .

Záverom, vyhodnocovanie experimentu zatiaľ nebolo ukončené a máme k dispozícii len predbežné výsledky. Ukázali sme, že blokáda mineralokortikoidných receptorov má pozitívny vplyv na percepciu stresu sprevádzajúceho rozvoj karcinómu mliečnej žľazy a mohla by predstavovať vhodnú adjuvantnú liečbu pri rakovine prsníka. Tento záver vyžaduje overenie v klinickom výskume. Budeme pokračovať v histologickom vyšetrení, analýzach a vyhodnocovaní vykonaného experimentu a naďalej sa budeme venovať výskumu úlohy mineralokortikoidných receptorov v kontexte ochorení podmienených stresom.

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu

po spoločnom posúdení

Názov projektu:

Testovanie nových terapeutických stratégií zacielených na karbonickú anhydrázu IX s využitím potenciálnych liečiv na báze monoklonových protilátok, inhibítorov a prírodných látok vo forme voľnej a viazanej v mikro- alebo nanočasticiach

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu a následné zmeny:

4245/13-221

3082/15-221

292/16-221/g

104/18-221

Kľúčové slová v projekte: xenografty, metastázy, monoklonálne protilátky

Účel projektu:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania
v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Karbonická anhydráza IX (CAIX) je transmembránový enzým prítomný v mnohých typoch solídnych aj metastázujúcich nádoroch. Expresia CAIX je prevažne regulovaná hypoxiou-indukovateľným faktorom (HIF) a napomáha pri udržiavaní homeostázy intracelulárneho pH v hypoxických podmienkach, čoho výsledkom je okysľovanie nádorového mikroprostredia. Okrem tejto hlavnej funkcie, moduluje E-kadherínom sprostredkovanú adhéziu cez väzbu s beta-katenínom, ktorá vedie k možnej hypoxiou indukovanej nádorovej progresii a tvorbe metastáz. CAIX je využívaná ako marker hypoxie a jej výskyt v nádoroch je predzvesťou zlej prognózy. Na druhej strane je však aj veľmi vhodným kandidátom na nasmerovanie liečby, keďže sa vyskytuje len v nádorovom tkanive a nie v zdravom. Liečba nasmerovaná na inhibíciu funkcie CAIX je veľmi intenzívne skúmaná.

Betablokátory sú liečivá štandardne využívané pri liečbe kardiovaskulárnych ochorení. Kompetujú s adrenalinom a noradrenalinom o väzbu s membránovo-viazanými beta adrenergnými receptormi. Adrenalin a noradrenalin patria medzi hormóny nepostrádateľné v odpovedi na stres. Práve stres a strata sociálnej opory u pacientov s diagnostikovaným nádorovým ochorením sú častými faktormi, ktoré zhoršujú progresiu ochorenia.

Karnozín (β -alanyl-L-histidin) je dipeptid prirodzene sa nachádzajúci v srdcovom a kostrovom svalstve a v centrálnom nervovom systéme. Je syntetizovaný z β -alanínu a L-histidínu pomocou karnozín syntázy vo svaloch, gliálnych bunkách a oligodendrocytoch. Karnozín hrá dôležitú úlohu v udržiavaní stáleho pH, pôsobí na funkciu kardiovaskulárneho systému, vrátane znižovania tlaku, potláča tvorbu cholesterolu a pôsobí ako antioxidant. Takisto potláča rast nádorov (glioblastóm, sarkómy) a na druhej strane zvyšuje rastový potenciál fibroblastov. Mechanizmus jeho účinku je však stále nejasný.

Xestospongín C je izolovaný z hubky *Xestospongia sp.* a funguje ako blokátor IP_3 -sprostredkovaného uvoľňovania vápnika v mitochondriách svalstva. Táto látka je momentálne študovaná ako vysoko senzitívny inhibítor IP_3 receptora, ktorý funguje ako vápnikový kanál a reguluje hladinu vápnika v bunkách a môže byť kritickým regulátorom bunkovej smrti (apoptózy).

Sulforafan je prirodzene sa vyskytujúca látka nachádzajúca sa v rôznych kapustovitých rastlinách, napríklad brokolici. Sulforafan spomaľuje rast rôznych druhov nádorov, ako je prsníkový, prostatický, nádor hrubého čreva, kože, pľúc, žalúdka alebo močového mechúra. Funguje ako antioxidant, zastavuje bunkový rast a spúšťa apoptózu nádorových buniek.

Nádorová hypoxia, teda znížené koncentrácie kyslíka v nádorovom tkanive v dôsledku nedostatočnej vaskularizácie, má za následok agresívnejšie a rezistentnejšie nádory, vďaka aktivácii bunkových procesov, ktoré tomu napomáhajú. Jednou z bunkových odpovedí na hypoxiu je zmena metabolizmu z oxidatívneho na glykolytický, v ktorom hrá významnú úlohu pyruvát dehydrogenáza kináza 1 (PDHK1). Pri takejto zmene metabolizmu, ktorý je výhodný pre rýchlo proliferujúce bunky, však taktiež dochádza k významnému okysľovaniu nádorového mikroprostredia, ktorému napomáha CAIX, ktorá udržiava intracelulárne pH neutrálne, čo napomáha samotným nádorovým bunkám v prežívaní, avšak okysľuje extracelulárne pH, čo destabilizuje medzibunkové kontakty a nádorové bunky môžu tak ľahšie invadovať, migrovať a metastázovať.

Regulácia procesov bunkovej migrácie, adhézie a proliferácie môže byť zabezpečená aj prostredníctvom solubilných foriem transmembránových (TM) proteínov vznikajúcich posttranslačným štiepením – sheddingom. CA IX je TM proteín zapojený do progresie nádorového fenotypu. Extracelulárna časť (ECD) CA IX podlieha sheddingu, a preto sú skúmané jej funkcie v nádorovom mikroprostredí a v cirkulácii.

CA IX je silne nádorovo-asociovaný proteín, ktorého expresia v nádoroch je spojená so zlou prognózou. Využíva sa ako diagnostický marker hypoxických nádorov a taktiež ako prognostický marker. Nakoľko je expresia CA IX silne indukovaná hypoxiou, nepredstavuje špecifický marker len pre určitý typ nádorov, ale je znakom väčšiny hypoxických karcinómov (prsníkových, kolorektálnych, cervikálnych, pľúcnych, glioblastómov atď.) pričom v zdravých tkanivách sa nenachádza. CA IX teda predstavuje sľubný terapeutický terč, ktorý by potenciálne mohol byť využitý pri terapii rôznych nádorov. Navyše, potenciálna biologická liečba pomocou anti-CA IX protilátok zároveň predstavuje vysoko špecifickú terapiu, kedy liečebná látka zasiahne len nádorové bunky. Takáto cielená terapia predstavuje oveľa menšie riziko vedľajších účinkov.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna NMRI nu/nu, samice a C57, samice

Plánovaný počet na celú dobu riešenia: 900 ks NMRI nu/nu samice; 100 ks C57 samice

Celkovo v projekte bolo použitých: 318 zvierat

264 ks NMRI nu/nu, 50 ks C57

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

zárok	krutosť
tetovanie	slabá
meranie xenograftov posuvným meradlom	slabá
váženie	slabá
aplikácia buniek (<i>s.c.</i>)	slabá
aplikácia buniek (<i>i.v.</i>)	slabá
opakovaná aplikácia liečiva (<i>i.p.</i>) tzv. "pretreatment"	stredná
opakovaná aplikácia luciferínu (<i>i.p.</i>)	stredná
opakovaná aplikácia liečiva (<i>i.p.</i>)	stredná
opakovaná aplikácia liečiva (<i>s.c.</i>)	stredná
opakovaná aplikácia liečiva (<i>i.v.</i>)	stredná
opakovaná <i>in vivo</i> analýza v narkóze	slabá
aplikácia anestézie	slabá
systémová reakcia na podávanie liečiv	stredná
vznik metastáz	krutá
preplach srdca a usmrtenie v narkóze	bez možnosti zotavenia
celková krutosť	krutá

Väčšina postupov v tomto projekte spadá do kategórie strednej krutosti. Myšiam boli pod kožu aplikované bunky za účelom vytvorenia xenograftov a následne im boli podávané liečivá. Podávanie liečiv však bolo 3 a viac krát opakované, takže postup klasifikujeme ako stredne krutý. U 118 (70 ks NMRI, 50 ks C57) použitých myší bol postup klasifikovaný ako krutý z dôvodu tvorby metastáz. V postupoch sme však nezaznamenali žiadne viditeľné zhoršenie stavu myší.

Ani v jednom štádiu pokusu nemali zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Zvieratá boli umiestnené v klietkach (max. 5 ks v jednej klietke) s vlastnou ventiláciou a označované budú skupinovými záznamovými kartami. Na konci experimentov boli zvieratá humanne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré sme vykonali na zvieratách v zrealizovaných pokusoch zaradíme do kategórie „stredné“ a „kruté“.

Súlad s požiadavkami “3R”

1. Nahradenie zvierat:

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

Rôzne kombinácie prírodných látok, liečiv, protilátok a inhibítorov sa študuje najmä v podmienkach *in vitro* prostredníctvom nádorových bunkových línií. Tieto modely však nedokážu úplne simulovať podmienky v nádorovom tkanive, ktoré okrem nádorových buniek obsahuje aj rôzne bunkové a molekulové komponenty nádorovej strómy, heterogénnu bunkovú hustotu a rôzne gradienty nutričných látok, iónov a kyslíka. Vznik a šírenie metastáz je veľmi špecifický proces, na ktorom sa zúčastňuje veľké množstvo zložiek imunitného systému, ovplyvňujú ho rôzne procesy v organizme, stav membrán a povrchov orgánov a krvného riečiska a mnoho ďalších faktory a nie je možné tento proces študovať v podmienkach *in vitro* a preto musíme využiť zvierací model. Funkciu a terapeutické využitie biologicky aktívnych látok ako aj vznik metastáz je preto nevyhnutné študovať aj na *in vivo* modeli myší. Ich funkciu a terapeutické využitie je preto nevyhnutné študovať aj na *in vivo* modeli myší s nádorovými xenograftami, alebo metastázami vytvorenými z ľudských nádorových buniek. Tento model umožňuje dosiahnuť relatívne štandardné podmienky rastu ľudských nádorov na nahých myšiach a sledovať terapeutický efekt všetkých účinných látok.

Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods:

<https://www.nc3rs.org.uk/results-search/all/xenograft> - Na tejto webovej stránke, bol nájdený projekt, ktorý sa zaoberá nahradením tvorby xenograftov, ale zatiaľ nebol ukončený a stále je v procese výskumu. Druhý projekt sa zaoberá nahradením zvierat, bunkovými kultúrami derivovanými z pacientov. Tento projekt je tiež zatiaľ len vo vývoji.; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=xenografts; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=metastasis; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=metastasis; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=colonisation+assay

nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš.

Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška č.436/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely.

Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch R (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade, keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch, pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesti, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

2. Obmedzenie počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovateľnosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná pokusná skupina v každom časovom intervale obsahovala minimálne 5 ks myší. Plánovaný počet zvierat je preto 318 ks. Opakovania postupov obmedzíme na nevyhnutné minimum a budú sa vykonávať len v prípade potreby overenia sporných výsledkov.

3. Zjemnenie:

Každodennú starostlivosť o zvieratá v pokusoch ykonával školený personál - pracovníci pokusného zariadenia.

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradíme do kategórie „stredná“ a „kruté“:

Všetky postupy budú ukončené tak aby u zvierat nedošlo k prejavom zhoršovania zdravotného stavu.

K dátumu 30.03.2019 sme vykonali spätné posúdenie projektu. Konštatujeme, že postupy ani klinické prejavy po podaní testovaných látok nepresiahli úroveň “stredné” u 194 zvierat a kruté u 118 zvierat (70 ks NMRI a 48 ks C57), počet použitých zvierat bol znížený a presne definovaný, krutosť bola klasifikovaná ako „stredná“ a “krutá”.

Netechnické zhrnutie projektu: *Aktualizované*

Názov projektu: Molekulárne mechanizmy adaptácie preimplantačného embrya

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro 3155/14-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Preimplantačné embryo, materský stres, poškodenie DNA, opravy DNA

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu: Projekt bol zameraný na štúdium skorého embryonálneho vývinu vo vzťahu k stavu materského organizmu, najmä na pôsobenie materského stresu.

V prvej časti projektu sme sledovali účinky materského stresu pôsobiaceho počas preimplantačnej vývinovej periódy na kvalitu myšacích embryí, pričom bol zohľadnený metabolický status materského organizmu. Sledovali sme aj dlhodobé účinky stresu pôsobiaceho v preimplantačnom období.

V druhej časti projektu sme skúmali molekulárne mechanizmy, ktorými stresové mediátory pôsobia v bunkách preimplantačných embryí. V rámci *in vitro* experimentov sme študovali signálne dráhy aktivované stresovými induktormi po poškodení DNA.

Prínos z vykonaného projektu: Výsledky získané na experimentálnom modeli myši sú priamo využiteľné v aplikovanom výskume v oblasti reprodukčnej medicíny ako aj vo veterinárnej medicíne.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: Modelovým zvieratám pre všetky postupy bola myš laboratórna (kmeň ICR). Počet použitých zvierat v postupoch za celé obdobie trvania projektu (01/2015-12/2018) neprekročil stanovený maximálny limit 3130 myší. Počet použitých zvierat v postupoch za celú dobu riešenia bol 2716.

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

Počas všetkých experimentov sme dbali na humánny prístup k zvieratám a nevystavovali sme ich žiadnym bolestivým zákrokom a ani zbytočnému stresu. Okrem krátkej imobilizácie, hormonálnej indukcie pohlavného cyklu (časť samíc), dietetických zmien u niektorých zvierat, neinvazívneho merania objemu tuku nebol pokusným ani kontrolným zvieratám spôsobovaný žiaden ďalší diskomfort. Ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu bola minimálna a odôvodnená vzhľadom k očakávaným výsledkom. Všetky invazívne zásahy (izolácia embryí a odber krvi) boli vykonané až po ich usmrtení.

Predpokladaná úroveň krutosti: Všetky postupy vykonávané v rámci postupov boli zaradené do kategórie krutosti „slabé“, tzn. zvieratá v ich dôsledku nepociťovali žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Plánované experimenty nebolo možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat. Doterajšie poznatky o problematike neumožňujú vytvorenie adekvátneho *in vitro* alebo počítačového modelu, ktorý by dokázal simulovať zložitý vzťah medzi stresom a metabolickým stavom matky a reprodukciou.

2. Redukcia počtu zvierat:

Jednotlivé experimenty boli zostavené tak, aby sme na dosiahnutie potrebných výsledkov použili čo najmenší počet zvierat a zároveň aby sme získali maximálne množstvo výstupných informácií z každého zvieraťa použitého v postupe. Zvieratá sme usmrcovali tak, aby sme mohli v odobratých vzorkách vyšetriť paralelne čo najviac parametrov. Získavanie biologického materiálu sme ukončili v okamihu, keď bola zabezpečená adekvátne kvantita vzoriek poskytujúca interpretovateľné a štatisticky preukazné výsledky. Počet použitých zvierat v postupe bol 2716, čo bolo menej ako bol schválený maximálny počet 3130 myší.

3. Zjemnenie:

Experimenty boli plánované tak, aby viedli k usmrteniu čo najnižšieho počtu zvierat, aby bola minimalizovaná bolesť, utrpenie a strach zvierat použitých v postupoch a aby mali zabezpečený primeraný welfare od narodenia až po usmrtenie. Zvieratá boli držané v prostredí so štandardnými zoohygienickými podmienkami s obohateným prostredím. Všetci pracovníci prichádzajúci do styku so zvieratami boli primerane poučení. Dbali na humánny prístup k zvieratám a nevystavovali ich zbytočnému stresu v žiadnej fáze postupov. Zdravotný stav bol pravidelne sledovaný, usmrtenie zvierat bolo zabezpečené cervikálnou dislokáciou. Hlavným dôvodom výberu myši laboratórnej bola vysoká reprodukčná schopnosť druhu (početnosť vo vrhu, rýchla generačná výmena, celoročný pohlavný cyklus myší), ktorá umožnila získanie potrebného biologického materiálu v relatívne krátkom čase.

Projekt podlieha opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Projekt sa spätne posudzuje aj napriek tomu, že klasifikácia krutosti je slabá. Členovia poradného orgánu navrhli projekt spätne posúdiť z dôvodu použitia veľkého množstva zvierat v súlade s § 36 ods. 2 písmeno f) NV 377/2012 Z.z.

Aktualizácia netechnického zhrnutia projektu k schválenému projektu rozhodnutím
č.k.3939/15-221

po spätnom posúdení

MOLEKULÁRNY MECHANIZMUS METABOLICKÝCH DÔSLEDKOV DLHODOBÉHO PRÍJMU
KOLOVÝCH NÁPOJOV

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je identifikácia mechanizmov, ktoré vedú k pozitívnym účinkom dlhodobého pitia kolových nápojov v experimentálnych zvieratách, čo má význam nielen pre možné odhalenie príčin a potenciálnych terapeutických cieľov u pacientov s metabolickým syndrómom, ale môže pomôcť odhaliť dôležité rozdiely v metabolizme experimentálnych zvierat a ľudí, čo umožní lepšie modelovať ľudské metabolické poruchy na zvieratách. Mechanizmy účinku kolových nápojov na metabolizmus zatiaľ neboli publikované vo vedeckej literatúre, hoci majú nesporný význam pre pochopenie biologickej podstaty sledovaných asociácií s metabolickým syndrómom u ľudí a naopak so zvýšenou inzulínovou senzitivitou u experimentálnych zvierat. Náš projekt bude realizovaný na experimentálnych zvieratách, ale v menšej miere aj na dobrovoľníkoch. V animálnych experimentoch budeme sledovať účinok koly na etablovaných modeloch ľudských chorôb a pokúsime sa o zavedenie nového modelu racionálnou kombináciou faktorov. V pokusoch použijeme bežne dostupné kolové nápoje, ktorých presné zloženie síce nie je známe, ale jednotlivé varianty bez obsahu cukru, resp. bez kofeínu umožňujú testovať aspoň dôsledky týchto známych zložiek. V projekte budeme používať viaceré modely metabolického syndrómu a jeho súčastí. Vychádzajúc z tých, ktoré sa najviac využívajú, budeme kombinovať jednotlivé faktory takým spôsobom, ako sa to deje priamo u pacientov, hoci to nesporne zvyšuje variabilitu a komplikuje interpretáciu. Zároveň však znižuje riziko klinicky irelevantných výstupov, ktoré nie sú reprodukovateľné kvôli mnohým špecifickým faktorom ako je napr. genetické pozadie zvierat.

SÚLAD ZÁSAD 3R

Dizajn pokusov, ako aj počet jedincov v skupinách bude vychádzať z dostupnej literatúry, ktorá je zameraná na podobné problémy. Toto je dôležité pre porovnateľnosť výsledkov s inými dátami, ale aj z hľadiska dodržania pravidla 3R pre experimenty so zvieratami. Analýza predbežných dát napr. z behaviorálnych testov poukazuje na to, že veľkosť skupiny by pri sile testu 90% a sledovanej variabilite, resp. rozdieloch mala dosahovať až $n=100$ pri hladine významnosti 5%. Tento prístup, žiaľ, nie je možné aplikovať, preto sa budeme musieť držať zaužívaných postupov a veľkostí skupín, kedy na 1 skupinu plánujeme 15 zvierat. Problém možnej falošnej negativity výsledkov sa budeme snažiť vyriešiť analýzou rovnakých veličín rôznymi testami, resp. metódami.

OČAKÁVANÁ UJMA A PRÍNOS

V rámci ujmy očakávame využitie približne 680 zvierat (340 samcov a 340 samíc) rôznych kmeňov (myši: 60 C57Bl6, 60 BalbC, 560 CD-1). Jednotlivé úkony, ktoré budeme realizovať sú nasledovné:

Handling zvierat v rámci výmeny podstielok a dopĺňania krmiva a pitiva – 2-3x za týždeň, úroveň krutosti slabá

Váženie a merania zkonsumovanej potravy a pitiva – 1x za týždeň, úroveň krutosti slabá

Odber krvi z retroorbitálneho venózneho plexu v celkovej anestézii Isofluranom – 1x za mesiac, úroveň krutosti stredná

Meranie krvného tlaku – 1x mesačne, vzhľadom na krátkodobú imobilizáciu do 30 min, úroveň krutosti stredná

Metabolické kliečky a zber moča – 1x mesačne, úroveň krutosti stredná

Behaviorálne testy – tzv. Fenotyper, t.j. domáca kliečka, ktorá je sledovaná kamerou na posúdenie lokomotorickej aktivity a tzv. test otvoreného poľa na sledovanie anxiózneho správania, - 1x za 3 mesiace, úroveň krutosti slabá.

Zviera bude usmrtené a vyradené z experimentu ak nastane nasledovné:

Pokles telesnej hmotnosti o viac ako 20%, znížený príjem potravy a tekutín pod 40% normálneho príjmu, resp anorexia po dobu 72h, piloerekcia s vypadávaním chlupov, samopoškodzovanie, a repetitívne správanie, neresponzivnosť na vonkajšie stimuly. Neočakávame mortalitu vyššiu v ani jednej skupine.

Vzhľadom na začatý hon na čarodejnice vo forme zakazovania a obmedzovania nezdravých potravín, kde kolové nápoje patria medzi prvé, ktorých predaj v niektorých štátoch je už obmedzený, resp. limitovaný (pozn. ani alkoholové nápoje nie sú regulované takýmto spôsobom ako sú kolové), považujeme výskum hľadajúci kauzálny vzťah a dôkaz o škodlivosti za prínos. Samotný experiment začína po tom, čo viacerí hlásili pri podobných experimentoch náznak presného opaku, t.j. že kolové nápoje môžu do istej miery pomôcť s inzulínovou rezistenciou a čiastočne ju zmierniť. Cieľom a výsledkom série experimentov má byť potvrdenie/vyvrátenie týchto pozorovaní a popísanie prípadných molekulárnych mechanizmov, ktoré túto rezistenciu ovplyvňujú. Prínosom je teda hľadanie antiobezitných mechanizmov v *in vivo* systémoch.

POPIS EXPERIMENTU

V dostupnej odbornej literatúre je iba minimum experimentov zameraných na účinok kolových nápojov na metabolizmus. Jednou z príčin môže byť, že kola je komplexná zmes s neznámym presným zložením, lenže výpovedná hodnota experimentov s konkrétnymi látkami pre prax je vágna.

Ide o jednoznačne originálny projekt, keďže zatiaľ nikto mechanizmus účinku kolových nápojov na metabolizmus neodhalil, hoci viaceré publikované výsledky poukazujú na možné mechanizmy a práve tie spolu s ďalšími chceme testovať. Originalita projektu zároveň tkvie v spojení kolových nápojov a stravy západného štýlu „Western diet“, čo tiež doteraz experimentálne na zvieratách nikto neskúmal. A napokon doteraz nikto neskúmal ani účinok kolových nápojov na metabolizmus pomocou genetických modelov, ktoré umožňujú identifikáciu konkrétnych signálnych ciest dôležitých pre sledovaný efekt. Ani sekundárne aspekty projektu nie sú menej originálne – nikto doteraz neskúmal pohlavné rozdiely v účinkoch kolových nápojov. Hoci problematika metabolického syndrómu je jednou z priorit celosvetového biomedicínskeho výskumu, podľa literatúry sa väčšina výskumu ohľadom kolových nápojov stále venuje najmä epidemiologickým asociačným štúdiám a nie intervenčným experimentom. Projekt je riskantný, už len samotná téma je kontroverzná a uvedomujeme si, že môže byť posudzovateľmi hodnotená aj negatívne. Nie sme nijakým spôsobom podporovaní, ani ovplyvňovaní v našom výskume akýmkoľvek výrobcom kolových nápojov. Naopak, sme presvedčení, že takéto experimenty sú dôležité, lebo majú potenciál

meniť dogmy, resp. presvedčenia, ktoré nie sú opreté o iné ako asociačné dáta. Vybrali sme si tému, ktorá je veľmi aktuálna, kde v rámci riešiteľského kolektívu máme aspoň v rámci Slovenska najlepších odborníkov na jednotlivé aspekty projektu.

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

POČET ZVIERAT

Druh/plemeno/línia	Pohlavie	Počet (za celé obdobie)	Počet na skupinu
Myši C57BL/6	Samce+ Samice	60	15
Myši BALB/c	Samce+ Samice	60	15
Myši CD-1	Samce+ Samice	240	15
Myši CD-1	Samce+Samice	320	15

Rozhodli sme sa, že experimentálne zvieratá nebudeme značiť na uchu, ale len na chvoste prostredníctvom permanentnej fixky. Považujeme totiž tento spôsob za menej stresujúci a zároveň bude zabezpečený častý kontakt so zvieratami. Odber moču budeme realizovať prostredníctvom metabolických kliebok, kde pobudnú zvieratá maximálne 12 hodín. V prípade že sa nám podarí získať dostatočné množstvo moča skôr, budú zvieratá odobraté z metabolických kliebok skôr, minimálne ale po 3h. Meranie krvného tlaku je ako stredná krutosť klasifikované preto, lebo očakávame krátkodobú imobilizáciu, ktorá sa bude pravidelne opakovať (raz mesačne). Samozrejme bude prebiehať aklimatizačné obdobie, kedy budú zvieratá krátkodobo v restraineroch, aby si na tento proces zvykli. Imobilizácia bude prebiehať maximálne 30 minút. Meranie krvného tlaku sa bude uskutočňovať prostredníctvom klasického tlakomeru.

Na zhodnotenie anxiety a lokomočnej aktivity použijeme test otvoreného poľa, pri ktorom použijeme arénu s podstavou štvorca (100 x100 cm). Testované zviera bude vložené do centra arény a v nej ponechané po dobu 5 minút. Sledovaným parametrom bude celková prejdená vzdialenosť, priemerná rýchlosť pohybu a čas, strávený v centrálnej časti bludiska. Viac času, stráveného v centrálnej časti, je známkou nižšej úrovne anxiety. Doplňujúcou ale dôležitou informáciou bude prejdená vzdialenosť aj rýchlosť pohybu. V experimentálnych štúdiách potkany aj myši chudli, nie priberali. Mechanizmus prečo, je to tak, zatiaľ nie je známe, ale predpokladáme, že v dôsledku účinku napr. kofeínu, by mohla byť zvýšená

lokomotorická aktivita, vedúca následne k vyššej fyzickej aktivite a väčšiemu energetickému výdaju.

Behaviorálny test vo fenotypéri funguje ako domáca klietka, kde sa sleduje dlhodobejšie ako sa zvierá správa. Poskytuje to bližší obraz o jeho behaviorálnych charakteristikách. Zvieratá sú umiestnené do boxu, kde majú k dispozícii potravu, tekutiny (pokusné skupiny kolový nápoj, kontrolné skupiny vodu). Box je virtuálne rozdelený na viaceré časti, pričom na rozdiel od testu otvoreného poľa, v tomto prípade majú možnosť tráviť čas aj v tzv. shelteri- „domčeku“. Piliny ako podstielka sa síce dávajú čisté, ale v princípe zmiešané s časťou pôvodných pilín z domácej klietky zvieratá. Tiež, fenotypéry sa nachádzajú v miestnosti, kde sú domáce klietky, čiže k presunu medzi miestnosťami neprichádza. Každý box (v našom prípade sú k dispozícii 4) má navrchu umiestnený kamerový snímač, ktorý detekuje zvierá po celý čas, ktorý vo fenotypéri strávi a ako sa pohybuje. Celý proces zaznamenávame a vyhodnocujeme v programe EthoVisionXT. Zvieratá budú ponechané vo fenotypéri 12 hodín. Pozorovanými parametrami sú celková prejdená vzdialenosť, priemerná rýchlosť pohybu, čas, strávený v centrálnej časti bludiska. V tomto prípade je potrebné zohľadniť aj fakt, koľko času strávi zvierá v svetelnej časti- mimo domčeka- a koľko v tmavej časti. Viac času, stráveného vo svetlej časti bludiska, odráža nižšiu úroveň anxiety. Bližšie info vid' <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/phenotyper>. Vzhľadom na to, že ide síce vo svete relatívne dlho používanú vec, nie je počet publikácií s týmto typom experimentu taký častý na hodnotenie lokomotorickej aktivity a anxiety. Pravdepodobnou príčinou bude vysoká cena (4 klietky vyše 40tisíc Eur), Preto 5-minútové behaviorálne testovania by sme tiež radi realizovali, ako štandardnú a vo svete predsa len rozšírenejšiu metódu.

Príslušné zvieratá v pokusných skupinách budú mať počas celého polroka k dispozícii len kolový nápoj. Jeden z parametrov, ktorý sa bude sledovať je prežívanie. Ak majú mať kolové nápoje negatívny vplyv na zdravie, mali by mať aj vyššiu mortalitu. Tú síce nepredpokladáme (keďže iné skupiny tento efekt experimentálne nepotvrdili), ale sledovať mortalitu budeme. Ak by bola výrazne vyššia ako u kontrolných zvierat, experiment ukončíme.

SPÄTNÉ POSÚDENIE

Projekt podliehal spätnému posúdeniu. Nateraz sa projekt skončil, rovnako tak 1.1.2019 skončilo povolenie ŠVPS na uvedené experimenty. V súčasnosti ešte prebiehajú zvyšné

biochemické a histologické analýzy. Po vyšetření mikrobiómu a vyhodnotení výsledkov je pravdepodobné, že budeme v projekte pokračovať, avšak až po opätovnom schválení ŠVPS SR.

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu

pospiťhom posídeus

Názov projektu: Úloha stresovej odpovede mezenchýmových stromálnych buniek v rezistencii ľudských nádorových buniek na liečbu

Číslo rozhodnutia o schválení projektu: Ro-1976/17-221 (pôvodne bol projekt schválený pod číslom Ro: 3108/14-221)

Kľúčové slová: karcinóm prsníka, karcinóm ovárií, mezenchýmové stromálne bunky, chemorezistencia

Účel projektu

Základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu bolo analyzovať mechanizmus, akým môžu ľudské mezenchýmové stromálne bunky (mesenchymal stromal cells, MSC) prispievať ku vzniku rezistencie na terapiu so zameraním na karcinóm mliečnej žľazy a ovárií. Predkladaný projekt bol a v súčasnosti stále je súčasťou nášho dlhodobého výskumu, v ktorom sledujeme pôsobenie a efekt nádorového mikroprostredia na biologické vlastnosti nádoru so špecifickým zameraním na úlohu MSC v navodenej chemorezistencii a agresivite ochorenia.

Prínos projektu

Výsledky projektu boli publikované vo viacerých karentovaných vedeckých prácach v medzinárodných časopisoch s vysokým impaktom. Všeobecne ich zahraniční posudzovatelia hodnotili ako veľmi zaujímavé, inovatívne a vedecky originálne. Tomuto nasvedčuje aj citovanosť na práce publikované v rámci projektu v krátkom čase. Celý projekt, ako bol navrhnutý, kombinoval moderné metódy molekulárnej a bunkovej biológie spolu s overovaním experimentálnych záverov na zvieracích modeloch. Takáto kombinácia dáva výsledkom a záverom dostatočnú váhu, a tým prispieva nielen k poznaniu základných mechanizmov liečby nádorového ochorenia prostredníctvom experimentálnej terapie, ale aj ku získaniu dostatočných argumentov pre prenos niektorých experimentálnych liečebných prístupov z predklinických modelov do klinickej praxe. Výsledky projektu jednoznačne ukázali veľkú perspektívu využitia novej terapeutickéj kombinácie na viaceré skupiny nádorov v individuálnom podaní.

Počet a druh použitých zvierat

Myš laboratórna

Plánovaný počet 704 ks/skutočne použitý počet 341 ks

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu

Metastázy sa prejavili úbytkom hmotnosti, sťaženým dýchaním, zhrbeným postojom a zježením srsti. Subkutánne nádory nemali negatívny vplyv na zdravie zvierat. Injekčné aplikácie vyvolali mierny krátkodobý stres.

Priradenie krutosti k jednotlivým postupom:

Postup	Predpokladaná krutosť	Skutočná krutosť	Poznámka
Váženie, denná kontrola zdravotného stavu	slabá	slabá	

Vyvolanie nádoru i.v. aplikáciou nádorových buniek	slabá	slabá	
Model subkutánných xenotransplantátov vrátane prežívania zvierat	stredná	slabá	U zvierat sme nepozorovali nekrózu alebo ulceráciu xenograftov, nádory nespôsobovali diskomfort, zvieratá boli utratené, ak nádor presiahol 1cm ³
Metastatické modely	krutá	krutá	
Aplikácia liečiva a MSC i.p. i.v.	slabá	slabá	
Prežívanie s vyvolanými metastatickými nádormi	krutá	stredná/krutá	Na základe čiastkových výsledkov sme boli schopní predpokladať prítomnosť metastáz, uplatňovali sme humánne ukončenie postupu

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Postupom *in vivo* predchádzali štúdie na bunkových kultúrach, vzhľadom ku komplexnosti výskumu však živé zvieratá nebolo možné nahradiť.

Obmedzenie

Počty zvierat v skupinách boli minimalizované tak, aby bolo možné získať signifikantné výsledky. V postupoch sme využívali kontrolné zvieratá pre viacero experimentálnych skupín, čo viedlo k zníženiu počtu použitých zvierat.

Zjemnenie

Počas riešenia projektu sme zaviedli monitorovanie zdravotného stavu zvierat podľa mimiky, aktívne sme využívali humánne ukončenie postupov, zaviedli sme pomôcky a postupy pre fixáciu zvierat počas kontroly a aplikácií, ktoré výrazne znížili stres a diskomfort.

Spätné posúdenie projektu

K 20. 3. 2019 sme vykonali spätné posúdenie projektu. Konštatujeme, že postupy ani klinické prejavy po podaní testovaných látok nepresiahli úroveň „slabé“ u slabé pre 11 zvierat, „stredné“ pre 229 zvierat, boli kruté pre 101 zvierat.

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu

po spätnom posúdení

Názov projektu:

Testovanie nových terapeutických stratégií zacielených na karbonickú anhydrázu IX s využitím potenciálnych liečiv na báze monoklonových protilátok, inhibítorov a prírodných látok vo forme voľnej a viazanej v mikro- alebo nanočasticiach

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu a následné zmeny:

4245/13-221

3082/15-221

292/16-221/g

104/18-221

Kľúčové slová v projekte: xenografty, metastázy, monoklonálne protilátky

Účel projektu:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania
v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:

Karbonická anhydráza IX (CAIX) je transmembránový enzým prítomný v mnohých typoch solídnych aj metastázujúcich nádoroch. Expresia CAIX je prevažne regulovaná hypoxiou-indukovateľným faktorom (HIF) a napomáha pri udržiavaní homeostázy intracelulárneho pH v hypoxických podmienkach, čoho výsledkom je okysľovanie nádorového mikroprostredia. Okrem tejto hlavnej funkcie, moduluje E-kadherínom sprostredkovanú adhéziu cez väzbu s beta-katenínom, ktorá vedie k nožnej hypoxiou indukovanej nádorovej progresii a tvorbe metastáz. CAIX je využívaná ako marker hypoxie a jej výskyt v nádoroch je predzvest'ou zlej prognózy. Na druhej strane je však aj veľmi vhodným kandidátom na nasmerovanie liečby, keďže sa vyskytuje len v nádorovom tkanive a nie v zdravom. Liečba nasmerovaná na inhibíciu funkcie CAIX je veľmi intenzívne skúmaná.

Betablokátory sú liečivá štandardne využívané pri liečbe kardiovaskulárnych ochorení. Kompetujú s adrenalinom a noradrenalinom o väzbu s membránovo-viazanými beta adrenergnými receptormi. Adrenalin a noradrenalin patria medzi hormóny nepostrádateľné v odpovedi na stres. Práve stres a strata sociálnej opory u pacientov s diagnostikovaným nádorovým ochorením sú častými faktormi, ktoré zhoršujú progresiu ochorenia. Cieľom postupu bolo zistiť chemoprotektívny efekt betablokátorov. V našich experimentoch sme dokázali, že podávanie betablokátora propranololu ešte

pred vznikom nádorov má chemoprotektívny efekt prejavujúci sa spomalením rastu xenograftov v nahých myšiach. Zároveň sme dokázali, že podávanie propranololu spomaľuje rast nádorov aj v podmienkach, keď je tento podávaný až po objavení sa nádorov. Výsledky našich experimentov potvrdili *in vitro* analýzy, v ktorých sme dokázali významný efekt propranololu na rast a proliferáciu nádorových buniek. Výsledky budú použité v pripravovanej publikácii. Ciele tohto postupu boli naplnené.

Karnozín (β -alaninyl-L-histidin) je dipeptid prirodzene sa nachádzajúci v srdcovom a kostrovom svalstve a v centrálnom nervovom systéme. Je syntetizovaný z β -alanínu a L-histidínu pomocou karnozín syntázy vo svaloch, gliálnych bunkách a oligodendrocytoch. Karnozín hrá dôležitú úlohu v udržiavaní stáleho pH, pôsobí na funkciu kardiovaskulárneho systému, vrátane znižovania tlaku, potláča tvorbu cholesterolu a pôsobí ako antioxidant. Takisto potláča rast nádorov (glioblastóm, sarkómy) a na druhej strane zvyšuje rastový potenciál fibroblastov. Mechanizmus jeho účinku je však stále nejasný. Cieľom čiastkového postupu bolo zistiť funkciu karnozínu pri znižovaní rastu xenograftov v *in vivo* modeli. V predchádzajúcich testoch sme na bunkových jednovrstvách ako aj na 3D modeli - sferoidoch dokázali spomalenie rastu buniek prípadne spomalený rast sferoidov. Rovnaký vplyv sa nám podarilo dokázať aj *in vivo* na myšiach. V imunohistochemických analýzach z xenograftov myší, ktorým bol podávaný karnozín, sme dokázali zvýšenú tvorbu HIF1- α a CAIX. Karnozín teda funguje v nádoroch tak, že sa viaže na CAIX, čo vedie k zmene jej konformácie a narušeniu jej funkcie. Preto by karnozín mohol byť vhodným protinádorovým liečivom nasmerovaným na inaktiváciu funkcie CAIX. Ciele tohto postupu boli naplnené a získané výsledky sú publikované v práci [1].

Xestospongín C je izolovaný z hubky *Xestospongia* sp. a funguje ako blokátor IP₃-sprostredkovaného uvoľňovania vápnika v mitochondriách svalstva. Táto látka je momentálne študovaná ako vysoko senzitívny inhibítor IP₃ receptora, ktorý funguje ako vápnikový kanál a reguluje hladinu vápnika v bunkách a môže byť kritickým regulátorom bunkovej smrti (apoptózy).

Sulforafan je prirodzene sa vyskytujúca látka nachádzajúca sa v rôznych kapustovitých rastlinách, napríklad brokolici. Sulforafan spomaľuje rast rôznych druhov nádorov, ako je prsníkový, prostatický, nádor hrubého čreva, kože, pľúc, žalúdka alebo močového mechúra. Funguje ako antioxidant, zastavuje bunkový rast a spúšťa apoptózu nádorových buniek. Cieľom tohto postupu bolo zistiť a objasniť úlohu xestospongínu a sulforafanu na rast ovariálnych nádorov. Rovnako zistiť aj synergetické pôsobenie týchto dvoch látok. V tomto postupe sme však žiaľ nedosiahli očakávané výsledky. Po podaní žiadnej z látok, Xestospongínu C, sulforafanu alebo kombinácie týchto dvoch látok nedošlo k spomaleniu rastu nádorov oproti kontrole. Tento výsledok si zatiaľ nevieme vysvetliť, ale po úprave dávkovania týchto látok, pravdepodobne postup zopakujeme. Ciele tohto čiastkového postupu neboli naplnené.

Nádorová hypoxia, teda znížené koncentrácie kyslíka v nádorovom tkanive v dôsledku nedostatočnej vaskularizácie, má za následok agresívnejšie a rezistentnejšie nádory, vďaka aktivácii bunkových procesov, ktoré tomu napomáhajú. Jednou z bunkových odpovedí na hypoxiu je zmena metabolizmu z oxidatívneho na glykolytický, v ktorom hrá významnú úlohu pyruvát dehydrogenáza kináza 1 (PDHK1). Pri takejto zmene metabolizmu, ktorý je výhodný pre rýchlo proliferujúce bunky, však taktiež dochádza k významnému okysľovaniu nádorového mikroprostredia, ktorému napomáha CAIX, ktorá udržiava intracelulárne pH neutrálne, čo napomáha samotným nádorovým bunkám v prežívaní, avšak okysľuje extracelulárne pH, čo destabilizuje medzibunkové kontakty a nádorové bunky môžu tak ľahšie invadovať, migrovať a metastázovať. Cieľom tohto čiastkového postupu bolo zistiť, či PDHK1 a CAIX majú vplyv na rast nádorových xenograftov. Zistili sme, že RKO kolorektálne nádorové xenografty s vyradeným génom pre PDHK1 (PDHK1 knock-out (KO)), alebo pre CAIX (CAIX knock-out) rastú signifikantne pomalšie ako kontrolné RKO nádorové xenografty,

pozitívne na PDHK1 a CAIX. Najpomalšie rástli nádorové xenografty s vyradenými oboma génmi (dvojité knock-outy, PDHK1- a CAIX-negatívne). Naše zistenia naznačujú, že PDHK1 a CAIX by mohli byť vhodnými terapeutickými cieľmi v terapii agresívnych, hypoxických nádorov. Ciele tohoto postupu sme naplnili a sú publikované v práci [REDACTED]

Okrem toho sme na rovnakých bunkách otestovali aj inhibítory CAIX – homosulfonamid (HSFA, 2 zlúčeniny). Tieto inhibítory, ktoré v ekvivalentnej koncentrácii spôsobovali spomalenie rastu nádorových buniek *in vitro* a znižovanie sferoidov, nemali efekt na rast xenograftov. Tento cieľ sa nám nepodarilo naplniť až ho nebudeme opakovať.

Regulácia procesov bunkovej migrácie, adhézie a proliferácie môže byť zabezpečená aj prostredníctvom solubilných foriem transmembránových (TM) proteínov vznikajúcich posttranslačným štiepením – sheddingom. CA IX je TM proteín zapojený do progresie nádorového fenotypu. Extracelulárna časť (ECD) CA IX podlieha sheddingu, a preto sú skúmané jej funkcie v nádorovom mikroprostredí a v cirkulácii. Cieľom postupu bolo sledovanie vplyvu sheddingu CA IX proteínu na rast nádorov a migračno-invazívne vlastnosti nádorových buniek reprezentované tvorbou experimentálnych metastáz. Pre štúdium solubilnej formy CA IX v postupoch *in vivo* sme používali stabilne transfekované melanómové bunkové línie, B16-neo (netvorí CA IX proteín), B16-FL-CA IX (normálny shedding CA IX), B16-NS-CAIX (defektný shedding CA IX) a B16-ECD-CAIX (kontinuálne uvoľňovanie ECD CA IX do média). V oboch typoch experimentov sme pozorovali rozdiely vo veľkosti a počte vzniknutých xenograftov/metastatických fokusov medzi líniami s normálnym a defektným sheddingom CA IX. Po subkutánnom podaní nádorových buniek sme po 14 dňoch pozorovali u xenograftov vzniknutých z B16-NS-CA IX buniek o 50% vyššiu váhu a o 58% väčší objem ako pri B16-FL-CA IX bunkách. V kolonizačnej analýze sme po 21 dňoch od intravenózneho podania buniek sledovali na pľúcach o 25% viac fokusov vytvorených B16-NS-CAIX bunkami. Tieto fokusy boli zároveň priemerne 2,45 násobne väčšie ako fokusy vytvorené B16-FL-CAIX bunkami. V krvných sérach myší, u ktorých sa vytvorili experimentálne metastázy z B16-FL-CAIX buniek sa nám ale podarilo dokázať zvýšenú hladinu viacerých protumorigénnych cytokínov. Ciele tohto postupu sa nám podarilo naplniť a budú publikované v práci [REDACTED]

CA IX je silne nádorovo-asociovaný proteín, ktorého expresia v nádoroch je spojená so zlou prognózou. Využíva sa ako diagnostický marker hypoxických nádorov a taktiež ako prognostický marker. Nakoľko je expresia CA IX silne indukovaná hypoxiou, nepredstavuje špecifický marker len pre určitý typ nádorov, ale je znakom väčšiny hypoxických karcinómov (prsňíkových, kolorektálnych, cervikálnych, pľúcnych, glioblastómov atď.) pričom v zdravých tkanivách sa nenachádza. CA IX teda predstavuje sľubný terapeutický terč, ktorý by potenciálne mohol byť využitý pri terapii rôznych nádorov. Navyše, potenciálna biologická liečba pomocou anti-CA IX protilátok zároveň predstavuje vysoko špecifickú terapiu, kedy liečebná látka zasiahne len nádorové bunky. Takáto cielená terapia predstavuje oveľa menšie riziko vedľajších účinkov. a) Tvorba experimentálnych pľúcnych metastáz. Pomocou špecifických anti-CA IX protilátok namierených voči rôznym doménam tohto proteínu sme sledovali, či inhibícia CA IX bude redukovať tvorbu metastáz v pľúcach. V postupe sme dokázali že, protilátky voči CA IX (M75 – voči proteoglykánovej doméne, Ab10 – voči enzymatickej doméne) signifikantne potláčali tvorbu pľúcnych metastáz. Tieto protilátky by potenciálne mohli byť využívané v antimetastatickej terapii. Ciele tohto postupu boli naplnené a postup nebude opakovaný.

b) Tvorba experimentálnych pľúcnych metastáz a efekt anti-CA IX protilátok na infiltráciu makrofágov. Cieľom tohto čiastkového postupu bolo otestovať, či anti-CA IX špecifické protilátky stimulujú infiltráciu makrofágov do metastatických ložísk. Injikovanie buniek predinkubovaných s

protilátkou voči CA-doméne proteínu CA IX (Ab10, IgG2a izotyp) spôsobilo vyššiu infiltráciu makrofágov do metastatických ložísk ako protilátka M75 (IgG2b izotyp). Makrofágmi realizovaná ADCC (od protilátok závislá bunková cytotoxicita) sprostredkovaná protilátkami voči CA IX, môže prispievať k potlačeniu tvorby metastáz opracovaných buniek. Ciele tohto postupu boli naplnené a výsledky budú zhrnuté v publikácii [REDACTED] Tento postup už nebude opakovaný.

c) Cieľom postupu bolo testovanie efektu anti-CA IX protilátok na rast primárnych nádorov. Podávanie protilátok voči proteínu CA IX spôsobilo výraznú inhibíciu rastu primárnych nádorov. Protilátky voči CA-doméne inhibovali rast o 40% (Ab20) a 50% (Ab10). Protilátky voči PG-doméne boli ešte účinnejšie. Protilátka Ab18 znížila veľkosť nádorov o 66% a protilátka M75 o 80% voči kontrolám. Z uvedených výsledkov vyplýva, že inhibícia CA IX špecifickými protilátkami by mohla byť potenciálne využívaná v protinádorovej terapii hypoxických nádorov. Cieľ tohto postupu bol naplnený a zatiaľ nebol opublikovaný.

Počet a druh použitých zvierat:

Myš laboratórna NMRI nu/nu, samice a C57, samice

Plánovaný počet na celú dobu riešenia: 900 ks NMRI nu/nu samice; 100 ks C57 samice

Celkovo v projekte bolo použitých: 318 zvierat

264 ks NMRI nu/nu, 50 ks C57

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

zárok	krutosť
tetovanie	slabá
meranie xenograftov posuvným meradlom	slabá
váženie	slabá
aplikácia buniek (<i>s.c.</i>)	slabá
aplikácia buniek (<i>i.v.</i>)	slabá
opakovaná aplikácia liečiva (<i>i.p.</i>) tzv. "pretreatment"	stredná
opakovaná aplikácia luciferínu (<i>i.p.</i>)	stredná

opakovaná aplikácia liečiva (<i>i.p.</i>)	stredná
opakovaná aplikácia liečiva (<i>s.c.</i>)	stredná
opakovaná aplikácia liečiva (<i>i.v.</i>)	stredná
opakovaná <i>in vivo</i> analýza v narkóze	slabá
aplikácia anestézie	slabá
systémová reakcia na podávanie liečiv	stredná
vznik metastáz	krutá
preplach srdca a usmrtenie v narkóze	bez možnosti zotavenia
celková krutosť	krutá

Väčšina postupov v tomto projekte spadá do kategórie strednej krutosti. Myšiam boli pod kožu aplikované bunky za účelom vytvorenia xenograftov a následne im boli podávané liečivá. Podávanie liečiv však bolo 3 a viac krát opakované, takže postup klasifikujeme ako stredne krutý. U 118 (70 ks NMRI, 50 ks C57) použitých myší bol postup klasifikovaný ako krutý z dôvodu tvorby metastáz. V postupoch sme však nezaznamenali žiadne viditeľné zhoršenie stavu myší.

Ani v jednom štádiu pokusu nemali zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Zvieratá boli umiestnené v kliečkach (max. 5 ks v jednej kliečke) s vlastnou ventiláciou a označované budú skupinovými záznamovými kartami. Na konci experimentov boli zvieratá humanne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré sme vykonali na zvieratách v zrealizovaných pokusoch zaradíme do kategórie “stredné” a „kruté“.

Súlad s požiadavkami “3R”

1. Nahradenie zvierat:

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

Rôzne kombinácie prírodných látok, liečiv, protilátok a inhibítorov sa študuje najmä v podmienkach *in vitro* prostredníctvom nádorových bunkových línií. Tieto modely však nedokážu

úplne simulovať podmienky v nádorovom tkanive, ktoré okrem nádorových buniek obsahuje aj rôzne bunkové a molekulové komponenty nádorovej strómy, heterogénnu bunkovú hustotu a rôzne gradienty nutričných látok, iónov a kyslíka. Vznik a šírenie metastáz je veľmi špecifický proces, na ktorom sa zúčastňuje veľké množstvo zložiek imunitného systému, ovplyvňujú ho rôzne procesy v organizme, stav membrán a povrchov orgánov a krvného riečiska a mnoho ďalších faktory a nie je možné tento proces študovať v podmienkach *in vitro* a preto musíme využiť zvierací model. Funkciu a terapeutické využitie biologicky aktívnych látok ako aj vznik metastáz je preto nevyhnutné študovať aj na *in vivo* modeli myši. Ich funkciu a terapeutické využitie je preto nevyhnutné študovať aj na *in vivo* modeli myši s nádorovými xenograftami, alebo metastázami vytvorenými z ľudských nádorových buniek. Tento model umožňuje dosiahnuť relatívne štandardné podmienky rastu ľudských nádorov na nahých myšiach a sledovať terapeutický efekt všetkých účinných látok.

Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods:

<https://www.nc3rs.org.uk/results-search/all/xenograft> - Na tejto webovej stránke, bol nájdený projekt, ktorý sa zaoberá nahradením tvorby xenograftov, ale zatiaľ nebol ukončený a stále je v procese výskumu. Druhý projekt sa zaoberá nahradením zvierat, bunkovými kultúrami derivovanými z pacientov. Tento projekt je tiež zatiaľ len vo vývoji.; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=xenografts; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=metastasis; https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=metastasis https://tsar.jrc.ec.europa.eu/search-test-methods-a?search_combined_anonymous=colonisation+assay

nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš.

Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška č.436/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely.

Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch R (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade, keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch, pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolesti, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

2. Obmedzenie počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovateľnosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná pokusná skupina v každom časovom intervale obsahovala minimálne 5 ks myši. Plánovaný počet zvierat je preto 318 ks. Opakovania postupov obmedzíme na nevyhnutné minimum a budú sa vykonávať len v prípade potreby overenia sporných výsledkov.

3. Zjemnenie:

Každodennú starostlivosť o zvieratá v pokusoch ykonával školený personál - pracovníci pokusného zariadenia.

Zvieratá boli vždy umiestnené v skupinách (5 ks) v IVC kliebkach so sterilnou hoblinovou podstielkou. Podmienky ustajnenia boli dodržiavané podľa prílohy 5 nariadenia vlády č.377/2012 Z. z.

Vo všetkých postupoch sme používali najšetrnejšiu inhalačnú anestézu a v prípade, že bolo zviera v anestéze v súvislosti so zobrazovacími technikami, vykonali sme na ňom všetky potrebné postupy (meranie xenograftov, aplikácia liečiva) kým bolo ešte v anestéze. Po anestéze boli zvieratá vždy sledované až kým sa neprebrali.

V prípade metastatického modelu, boli zvieratá po aplikácii buniek v postupe čo najkratšiu možnú dobu. Na zvieratách nedošlo k prejavu žiadnych príznakov nepohody ani zmenám výrazu tváre (DJ Langford et al., 2010). V prípade xenograftov boli zvieratá vždy usmrtené ešte pred dosiahnutím veľkosti 1cm³. V žiadnom prípade nedošlo k zhoršeniu zdravotného stavu zvierat ani k žiadnym problémom súvisiacim s anestézou.

Všetkým zvieratám bola pred usmrtením podaná inhalačná anestéza.

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradíme do kategórie „stredná“ a “kruté”:

K dátumu 30.03.2019 sme vykonali spätné posúdenie projektu. Konštatujeme, že postupy ani klinické prejavy po podaní testovaných látok nepresiahli úroveň “stredné” u 194 zvierat a kruté u 118 zvierat (70 ks NMRI a 48 ks C57), počet použitých zvierat bol znížený a presne definovaný, krutosť bola klasifikovaná ako „stredná“ a “krutá”.

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu

po spätnom posúdení

Názov projektu: Neuroprotektívne mechanizmy zahrnuté v stimulácii AT2 receptora po traumatickom poranení miechy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2855/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): traumatické poranenie miechy, AT2 receptor, neuroprotektia.

Účel projektu: základný výskum

Opísať ciele projektu:

Traumatické poranenie miechy predstavuje vážny medicínsky problém, ktorý výrazne ovplyvňuje kvalitu života postihnutých jednotlivcov. Intenzívny výskum mechanizmov poškodenia miechy priniesol v posledných rokoch množstvo sľubných terapií, ale výsledky klinických skúšok boli prevažne negatívne a žiadna z nich nebola úplne akceptovaná pre ich uplatnenie v klinickej praxi. Poznanie základných mechanizmov prebiehajúcich v nervovom tkanive za fyziologických a patologických podmienok je však nevyhnutným predpokladom pre úspešnú terapeutickú intervenciu. Ciele projektu vychádzali z hypotézy, že po traumatickom poranení dochádza v poškodenej mieche ku expresii AT2 receptorov, ktoré sa v nej za fyziologických podmienok nenachádzajú. Naša hypotéza bola potvrdená v cieľi č. 1, ktorým bola charakterizácia prítomnosti týchto receptorov v mieste poškodenia. Na cieľ č. 1 nadväzovalo stanovenie rozsahu neuroprotektívneho účinku stimulácie AT2 receptorov a potreba týchto receptorov v neuroprotekcii (cieľ č. 2). Získané výsledky poukázali na dôležitú úlohu AT2 receptorov v neuroprotekcii po traumatickom poranení miechy.

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

Sekundárne poškodenie je dôsledkom širokej kaskády patologických procesov prebiehajúcich v nervovom tkanive miechy po jej traumatickom poranení. Potlačenie sekundárneho poškodenia miechy je veľmi dôležitým vedeckým cieľom v terapeutickú intervenciu, ktoré by umožnilo zachovať väčšie množstvo nervového tkaniva, čím sa vytvorí lepšie podmienky pre regeneráciu a následnú obnovu nervového tkaniva. Získané výsledky prispievajú k lepšiemu objasneniu patológie poškodenia a k využitiu endogénnych neuroprotektívnych mechanizmov v cielej liečbe.

Druhy použitých zvierat a ich počty:

V experimentoch boli použité dospelé samice laboratórneho potkana kmeňa Wistar v počte 118ks za celú dobu riešenia projektu.

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

Experimentálnym zvieratám bola kompresným poranením miechy navodená paraplégia, t. j. obojstranné ochrnutie dolných končatín. Zvieratá však boli schopné pohybu pomocou predných labiek. Postupne dochádzalo u experimentálnych zvierat k vylepšeniu neurologickej funkcie zadných končatín až do takej miery, že zvieratá po 28 dňoch od kompresie zapájali do pohybu aj zadné končatiny. Aj keď kompresné poranenie miechy spôsobilo u zvierat dysfunkciu močového mechúra, t. j. neschopnosť samostatne močiť, po približne 22 dňoch bola u všetkých zvierat táto funkcia prinavrátená. Počas dysfunkcie močového mechúra bolo robené jeho manuálne vyprázdňovanie riešiteľmi projektu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov bola navrhnutá klasifikácia krutosti postupu ako „krutá“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Poranenie miechy ako aj jej následná regenerácia sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nebolo možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

V porovnaní s pôvodne plánovaným počtom zvierat (184 ks) bolo v experimente celkovo použitých 118 zvierat. K zníženiu počtu došlo z dôvodu nižšej variability výsledkov ako bolo pôvodne očakávané a daný počet zvierat bol postačujúci pre štatistické vyhodnotenie sledovaných parametrov.

3. Zjemnenie:

Všetky operačné zákroky uskutočnené na zvieratách boli vykonávané v celkovej anestéze, t. j. neboli pre zvieratá bolestivé. Bezprostredne po navodení traumy bol zvieratám subkutánne podaný sterilný fyziologický roztok z dôvodu prevencie dehydratácie. Až do prebratia z anestézy boli experimentálne zvieratá umiestnené na ohrievacej podložke nastavenej na teplotu 37,5°C. Experimentálne zvieratá potom boli umiestnené najprv individuálne a po zahojení operačných rán v pároch do kliebok s prístupom k potrave a vode *ad libitum* a umiestnené vo zverinci. V priestoroch zverinca zotrvali 28 dní. Zvieratá napriek paraplégii po zotavení z anestézy boli schopné pohybu v klietke za pomoci predných labiek. Napriek tomu, že zvieratá boli schopné samostatne prijímať vodu a potravu zo zásobníka, malé kúsky štandardnej potravy boli umiestnené priamo v klietke. Prijem vody u zvieraťa bol monitorovaný na základe spotreby vody v napájacej fľaši, plnosti močového mechúra a prítomnosti moču. Prijem potravy bol sledovaný na základe spotreby štandardizovanej peletovej stravy a prítomnosti stolice. Celkový stav zvierat bol po postupe každodenne pozorovaný, a v prípade potreby podávané analgetiká. Prenášanie alebo zdvíhanie zvierat po traume miechy bolo prevádzané chytením celého zvieraťa z dorzálnnej strany sprekríženými prednými labkami v blízkosti tela manipulujúcej osoby. V prípade dysfunkcie močového mechúra bolo robené jeho manuálne vyprázdňovanie a abdominálna časť zvieraťa umytá vlažnou vodou, osušená gázou a zviera umiestnené naspäť v klietke. Keďže obohatené prostredie znižuje stres a prispieva k lepšej regenerácii štandardná podstielka bola nahradená papierovými pilinami a do kliebok boli umiestnené krátke plastové rúry a/alebo kartónové krabice poskytujúce pocit bezpečia potrebné pre zvieratá po náročnom zákroku.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu - po späťnom posúdení

Názov projektu:

Overenie biologických efektov anorganických nanočastíc *in vivo* na základe výsledkov získaných na platforme vyvinutej na skrýning toxicity nanomateriálov *in vitro*.

Číslo rozhodnutia o schválení projektu: 1976/17-221

Kľúčové slová:

Anorganické nanomateriály, potkany Wistar, imunotoxicita, histológia, genotoxicita, molekulárno-genetické analýzy

Účel projektu:

Základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom projektu je overiť vhodnosť/funkčnosť multimodulárneho vysokovýkonného testovacieho systému (platformy), ktorý bol vyvinutý na sledovanie biologickej bezpečnosti/toxicity nanomateriálov (NM) *in vitro*. Cieľom je zistiť, či navrhnutá platforma je schopná simulovať fyziologické odpovede živého organizmu po expozícii NM, *t.j.* identifikovať, či pripravený multifunkčný testovací systém poskytuje podobné/porovnateľné biologické odpovede ako experimenty *in vivo*.

Prínos projektu:

Potvrdenie funkčnosti platformy otvára možnosti pre úplne nový, komplexný prístup k posudzovaniu biologickej bezpečnosti NM na fyziologickom princípe a predstavuje inovatívny skrýningový nástroj na profiláciu potenciálneho rizika NM. Takáto inovatívna platforma je kľúčová pre reálne zhodnotenie bezpečnosti NM a efektívnu identifikáciu dráh s potenciálne nepriaznivým biologickým efektom. V súčasnosti žiadna takáto flexibilná a jednoduchá skrýningová platforma s flexibilne kombinovateľnými senzormi na čipoch nie je dostupná na trhu.

Testované anorganické nanomateriály (ANM) nevykazovali žiadne nepriaznivé biologické účinky *in vivo*. Tieto výsledky boli v súlade s výsledkami získanými z *in vitro* experimentov. Naše zistenia ukázali, že sledované nanomateriály pri použití fyziologických koncentrácií nemusia predstavovať bezprostredné riziko pre ľudské zdravie.

Prínosom projektu bolo efektívne využitie orgánov a tkanív odobraných z kontrolných a ovplyvnených zvierat. Okrem biologických a molekulárno-genetických analýz, ktoré sa realizovali/realizujú na našom pracovisku (ÚEO BMC SAV) boli biologické vzorky zaslané na ďalšie špecializované pracoviská doma a v zahraničí, z dôvodu získania komplexného obrazu o pôsobení ANM na živý organizmus:

Universität des Saarlandes, Germany - analýza zmien v hladinách miRNA (epigenetické zmeny)

Slovenská zdravotnícka univerzita - biochemické a imunologické analýzy,

Slovenská technická univerzita - kvantifikácia množstva ANM akumulovaných vo vybraných orgánoch

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach – analýza histo-patologických zmien v tkanivách vybraných orgánov (pečeň, pľúca, obličky, slezina).

Komplexný prístup k hodnoteniu potenciálneho rizika ANM umožní objektívne posúdiť ich biologickú bezpečnosť.

Počet a druh použitých zvierat:

- Plánovaný počet 80 ks/skutočne použitý počet 80 ks
- potkan laboratórny kmeň Wistar, samce;
- vek 6-8 týždňov;
- dĺžka experimentu - 36 dní.

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

Aplikácia testovaných anorganických nanomateriálov (PEG-ované nanočastice zlata, PEG-AuNPs a nanočastice oxidu titánu TiO₂NPs) nemali žiadne závažné zdravotné komplikácie, ktoré by sa prejavila stratou hmotnosti nad 20%, vypadávaním srsti, alebo zmenami v držaní tela indikujúce bolesť, ktoré by boli dôvodom predčasného utratenia zvierat.

Priradenie krutosti k jednotlivým postupom:

Postup	Predpokladaná krutosť	Skutočná krutosť
Váženie	slabá	slabá
Podanie testovaných látok sondou	slabá	slabá
Injekčná aplikácia testovaných ANM (i.v.)	slabá	slabá
Možná toxicita	stredná-krutá	slabá
Usmrtenie letálnou dávkou thiopentalu (i.p.)	žiadna	slabá

Súlady s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Hlodavce v tomto štádiu výskumu nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Experimentom na zvieratách predchádzali štúdie v *in vitro* podmienkach.

Obmedzenie:

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich projektov, údajov z vedeckej literatúry a našich *in vitro* štúdií sme boli schopní odhadnúť základné dávkovanie nanočastíc. Počet zvierat v skupinách bol minimalizovaný tak, aby mohli byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené.

Zjemnenie:

Zvieratá boli držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Injekčné aplikácie boli zrealizované po uspatí zvierat'a čo minimalizovalo traumatizáciu zvierat'a. Na projekte sa podieľali len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Spätné posúdenie projektu:

Vzhľadom k tomu, že nebolo možné vylúčiť systémovú toxicitu testovaných látok, ktorá by mohla byť hodnotená ako „krutá“, k 8.1.2019 sme vykonali spätné posúdenie projektu. Konštatujeme, že postupy ani klinické prejavy po podaní testovaných látok nepresiahli úroveň „slabé“.