

AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

Po spätnom posúdení
Názov projektu:
Skriningový test reprodukčnej/vývinovej toxicity (OECD 421) s látkou 1-(9,9-Dibutyl-9H-fluoren-2yl)-2-methyl-2-morpholin-4-yl-propan-1-one (synonymum NPI-20400)
(Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (OECD 421))

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-4599/17-221 a Ro-213/18-221

Kľúčové slová v projekte:

Toxicita po opakovanom podaní, reprodukčná toxicita, REACH

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Cieľom projektu – štúdie bolo vyšetriť potenciál testovanej látky 1-(9,9-Dibutyl-9H-fluoren-2yl)-2-methyl-2-morpholin-4-yl-propan-1-one vyvolať poškodenie reprodukčnej schopnosti ovplyvnených samcov a samíc potkana tak ako funkcia pohlavných žliaz, reprodukčné správanie, počatie, gravidita, pôrod a ovplyvniť raný postnatálny vývin potomstva. Navyše, cieľom bolo poskytnúť informáciu o potenciálnych škodlivých účinkoch na vybrané endokrinné parametre. Súhrne, získať podklady k posúdeniu bezpečnosti chemickej látky z hľadiska jej potenciálu vyvolať toxickú reakciu po opakovanom podaní a vyjadriť sa k možným negatívnym vplyvom na reprodukčné a vybrané endokrinné parametre v súlade s metódou OECD 421.

Prínos z vykonaného projektu:

Projekt poskytol v plnom rozsahu relevantné informácie požadované z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton za 1 rok. Pokusná a pozorovacia stratégia boli jednoznačne dané metodikou OECD 421.

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

Prínosom tejto štúdie bolo včasné rozpoznanie toxicity testovanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na rodičovský organizmus v reprodukčnom veku a na organizmus potomstva v ranom štádiu vývinu.

Druhy použitých zvierat a ich počty:

V štyroch pokusných skupinách (3 dávkové a 1 kontrolná) bolo použitých 40 samcov a 52 samíc potkanov kmeňa Wistar. Narodilo sa 480 mláďat (248 samcov a 232 samíc).

Pôvodne schválený počet dospelých zvierat na projekt bol 50 samcov a 62 samíc. Tieto počty v sebe začleňovali aj satelitné skupiny, 10 samcov a 10 samíc (5 zvierat/satelit ku kontrolnej skupine a 5 zvierat/satelit ku najvyššej dávkovej skupine z každého pohlavia). Pri realizácii

projektu sme napokon satelitné skupiny nepoužili, čím sa počet skutočne použitých dospelých zvierat znížil na 40 samcov a 52 samíc. Zvieratá v satelitných skupinách nie sú zaradené v rodičovskom jadre, používajú sa na sledovanie reverzibility/ireverzibility zmien, ktoré sa sledujú po uplynutí 2 týždňov bez aplikácie zvierat tzv. „recovery period“.

V danom projekte bol povolený iba orientačný odhad 400 mlád'at, reálny počet mlád'at bol vyšší. Rodičovské jadro pozostávajúce zo 40 samcov a 52 samíc prinieslo potomstvo 480 mlád'at, ktoré boli všetky použité vo vývinovej časti štúdie. Pri plánovaní projektu a odhade počtu mlád'at sme zvažovali potenciálny efekt testovanej látky aj na počty mlád'at vo vrhoch, ktorý sa napokon neprejavil, ako to bolo zjavné pri hodnotení počtu implantačných miest, postimplantačných strát a strát vrhov počas laktácie.

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

V rámci projektu bolo akékoľvek zhoršenie zdravotného stavu zvierat bezodkladne konzultované s veterinárnym lekárom, aby boli v prípade ťažkých stavov humánne utratené podľa deklarovaných „human endpoints“.

Počas realizácie projektu nebolo pozorované žiadne zhoršenie zdravotného stavu, ktoré by si vyžadovalo predčasné humánne utratenie pokusných zvierat.

Súhrne, nebol zaznamenaný úhyn spôsobený testovanou látkou, všetky zvieratá prežívali bez akýchkoľvek príznakov toxicity, bez zmien zdravotného stavu a správania.

Úroveň krutosti:

Pokus bol pri plánovaní hodnotený/klasifikovaný ako slabo krutý až krutý. V projekte bola použitá látka, ktorá nebola doposiaľ testovaná a preto sa nedala vylúčiť systémová reakcia, ktorá by bola kategorizovaná ako krutá.

Vzhľadom na získané výsledky je možné projekt vyhodnotiť ako stredne krutý, keďže ako stredne kruté boli hodnotené úkony ako odber krvi a denná orálna aplikácia pokusných zvierat so zreteľom na gravidné samice.

Uplatňovanie zásad 3R

V projekte boli zohľadňované zásady 3R. V rámci projektu neboli vykonané bolestivé zákroky, pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť. Použité počty zvierat v pokuse boli primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu vychádzajúc z požiadaviek metodiky OECD 421.

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 mlád'atá.

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

Názov projektu:

Krátkodobá a dlhšie trvajúca adaptácia myokardu ako prevencia zlyhávania srdca: štúdium molekulárnych mechanizmov

Kľúčové slová v projekte:

ischémia myokardu, adaptácia, mechanizmy kardioprotekcie, ischemicko/reperfúzne poškodenie

Účel projektu:

Odhaľovanie vplyvu a porovnávanie účinnosti dvoch rôznych adaptačných stimulov a ich molekulárnych mechanizmov na odolnosť srdca voči ischemicko/reperfúznemu poškodeniu u normálnych zvierat a u potkanov s ďalšími komorbiditami (diabetes, hypertenzia).

1a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a typoch zvierat, ktoré sa použijú

Opísať ciele projektu:

Vzhľadom k tomu, že v humánnej medicíne neexistujú dostatočne účinné terapeutické opatrenia na prevenciu infarktu myokardu ani na redukciu I/R poškodenia, ochrana srdca pred ischémiou ostáva najväčšou výzvou pre klinických a experimentálnych kardiológov a je nutné skúmať alternatívne metódy s využitím poznatkov získaných vo výskume.

Chceme sa zamerať na také postupy, kde je možné použiť adaptačné zásahy za účelom zvýšenia odolnosti voči ischemickej záťaži, a to u normálnych potkanov ako aj u zvierat ktoré budú vystavené civilizačným ochoreniam ovplyvňujúcim ľudskú populáciu, akými sú ischémia myokardu, vysoký krvný tlak a diabetes. Cieľom je dokázať možnosť zlepšenia fyziologických a biochemických parametrov srdca a zvýšenia odolnosti srdca voči I/R poškodeniu pri použití dvoch neinvazívnych adaptačných zásahov, porovnať ich účinnosť v súvislosti s dĺžkou stimulu a odhaliť ich molekulárne mechanizmy.

1. Charakterizovať stavy vyúsťujúce do zlyhávania funkcie srdca a jeho akceleráciu prítomnosťou ďalších komorbidít.

2. Testovanie vplyvu adaptačných zásahov na vývoj funkčných zmien v myokarde a jeho odolnosti voči ischemickej záťaži pri použití modelu dobrovoľne behajúcich potkanoch a modelu remote ischemického preconditioningu (RIPC).

3. Posledným cieľom bude charakteristika zmien v mechanizmoch bunkovej signalizácie pri zlyhávaní srdca ako aj pri vzniku kardioprotekcie s dôrazom na proteínkinázové kaskády pri použití modelu dobrovoľne behajúcich potkanoch a modelu RIPC.

Prínos z vykonaného projektu:

Zvolené postupy majú umožniť získanie originálnych poznatkov využiteľných v klinickej praxi nakoľko ide o aktiváciu vlastných ochranných mechanizmov v myokarde neinvazívnymi metódami. Prínosom projektu je zámer skúmať účinnosť týchto metód pri krátkodobom a dlhšie

trvajúcim použitím za účelom zmiernenia ischemicko-reperfúzneho poškodenia srdca vrátane infarktu myokardu, nielen u zdravých jedincov ale aj u jedincov s civilizačnými ochoreniami (hypertenzia, diabetes). Údaje získané pri riešení projektu pomôžu objasniť vplyv a účinnosť neinvázneho pôsobenia fyziologických a patologických stimulov na úrovni bunky a orgánu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty v pokuse krátkodobom a dlhodobom pokuse
Dospelé samce potkana laboratórneho (*Rattus norvegicus*): celkovo 480 ks potkanov na celé obdobie trvania pokusov v krátkodobej + dlhodobej adaptácii

- potkan laboratórny, kmeň Wistar, vek 2 - 3 mesiace, 280 ks
- potkan laboratórny, kmeň Sprague Dawley, vek 2 - 3 mesiace, 80 ks
- potkan laboratórny, kmeň Spontaneously hypertensive rat, 2 - 3 mesiace, 120 ks

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:
Zvieratám v skupine diabetes mellitus (DM) I. typu bude jednorazovo intraperitoneálne podaná toxická dávka farmaka streptozotocínu (65 mg/kg rozpustený v 0.1 mol/l citrátovom pufri, pH=4) spôsobujúceho poškodenie β buniek pankreasu. Po prekonaní prvých hodín sa zvieratá rýchlo zotavujú a po 24 hodinách nejaví známky diskomfortu. V prípade, že sa zvieratá do 24 hodín nezotavia, budú následne vyradené z experimentálnej skupiny a ihneď humánne usmrtené.

Typickými príznakmi pri vývoji diabetes mellitus je nadmerný smäd, preto viac pijú (polydipsia), a s tým je spojená aj polyúria, pokles telesnej hmotnosti a vzhľad (suchá srst' bez lesku).

Po prekonaní akútnej fázy ochorenia, stav zvierat sa ustáli a k ďalšiemu výraznému zhoršeniu stavu v priebehu 6 týždňov už nedochádza, ako sme aj my potvrdili v experimentoch s akútnym a chronickým DM (Ravingerová et al., 2003).

Krutosť postupu pri akútnom a chronickom DM je klasifikovaná ako *stredná krutosť*.

Diabetes mellitus sa deteguje na tretí deň po injekcii streptozotocínu. Tieto zvieratá sa bezprostredne po zistení zvýšenej hladiny glukózy umiestnia do klietok vybavených kolesom na behanie, kde zostanú do dobu 2 týždňov alebo 6 týždňov. Krutosť postupu je klasifikovaná ako *stredná krutosť*.

Potkany v skupine cvičiacich potkanov budú umiestnené v klietkach samostatne, aby bolo možné monitorovať ich pohybovú aktivitu. Potkany tak budú v čiastočnom sociálnom strese, no budú držané v priehľadných klietkach v miestnosti s inými potkanmi, takže s nimi budú môcť komunikovať prostredníctvom zraku, vokalizácie a pachov. Beh je prirodzenou činnosťou pre potkana, ktorú robia dobrovoľne. Pri zachovaní vnemov je stres zmiernený a v akútnom pokuse je krutosť klasifikovaná ako *slabá krutosť*. Pri dlhšie trvajúcim behaní je krutosť oklasifikovaná ako *stredná krutosť*.

Vyvolanie RIPC: Po uvedení potkana do celkovej anestézie sa na jeho zadnú končatinu umiestni malá tlaková manžeta a aplikujú sa tri 5-minútové cykly nafúknutia manžety (200 mmHg) a vyfúknutia, za účelom striedavého zastavenia a obnovenia prietoku krvi v končatine (Ravingerová et al., 2016, 2017).

Po ukončení jednej epizódy RIPC nasleduje postup podľa zaradenia do príslušnej skupiny.

Úplná eliminácia účinkov anestetika prebehne väčšinou do 2-3 hodín po jednorazovom i.p. podaní. Zhoršenie zdravotného stavu pri tomto postupe nenastane, nakoľko je porovnateľný s meraním krvného tlaku u človeka, kde frekvencia nafukovania/vyfukovania tlakovej manžety je často krát oveľa vyššia ako v danom experimente. Krutosť postupu je klasifikovaná ako *slabá*.

Pri opakovanom RIPC zvieratá nebudú mať problémy s bolesťou v zadnej končatine ani s chôdzou. Rozostúp medzi jednotlivými aplikáciami RIPC (1 krát v týždni) je dostatočne veľký na elimináciu prípadného okamžitého diskomfortu, ktorý je porovnateľný s meraním krvného tlaku u človeka. Navyše končatinový sval je oveľa odolnejší voči zásahom spojeným s obmedzením a obnovením prietoku krvi, napr. v porovnaní so svalom srdca. Krutosť postupu je klasifikovaná ako *stredná*.

Potkany, ktorým bude vykonané meranie EKG a echokardiografia, budú na dobu merania (15 minút) vystavené izofluránovej inhalačnej anestézii. Krutosť postupu je klasifikovaná ako *slabá*.

Podľa prílohy č.4 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť plánovaných postupov ako „*slabú až strednú krutosť*“.

1b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

požiadavka nahradenia

Predkladaný projekt je zameraný aj na pozorovanie funkcie srdca vystaveného ischémii u potkanov ovplyvnených dobrovoľným behaním a RIPC, a to na úrovni tkaniva, buniek a subcelulárnej úrovni. Tieto pokusy je možné len doplniť meraním na celých zvieratách (napr. magnetická rezonancia, sonografia celých zvierat v anestézii). Pokusy sa nedajú nahradiť len pozorovaním na bunkových kultúrach, pretože nezodpovedajú vlastnostiam buniek v živom orgáne. Rovnako nie je možné tieto metódy nahradiť počítačovou simuláciou.

požiadavka redukcie

Projekt bol optimalizovaný z hľadiska minimalizácie počtu použitých zvierat, pričom bude použitý minimálny počet zvierat potrebný na dosiahnutie štatisticky signifikantných výsledkov, u ktorých je možná jednoznačná interpretácia dát kombinovanými fyziologickými a biochemickými analýzami. Získané experimentálne dáta priebežne vyhodnocujeme, čím predchádzame zbytočnému navrhovaniu počtu experimentov.

požiadavka zjemnenia

Zvieratá budú po presunutí z chovného zariadenia v aklimatizácii. Po dobu 5 dní budú umiestnené po 2-4 jedincoch v dostatočne veľkých klietkach (rozmery 60×70×45cm, plocha 4200 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Potkany v priebehu pokusu prežívajú slabý stres, ktorý bude minimalizovaný šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia klietky predmetmi na hru a ohryzovanie. Na minimalizáciu bolesti zvierat pri injekčnej aplikácii farmák a anestetika používame tenké, sterilné ihly s rozmermi 0,3 x 12mm (priemer x dĺžka). Aplikáciu farmák a anestetík vykonáva vždy osoba, na ktorú sú zvieratá zvyknuté pomocou manipulácie. Jednotlivé postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo utrpenie, bolesť a strach zvierat a sú oklasifikované ako *slabá až stredná krutosť*. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov charakterizovaného v tabuľke human end points budú zvieratá humanne usmrtené po konzultácii s veterinárnym lekárom. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokéj celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Podľa § 36 ods. 2 písm. f) sa pri tomto projekte nevyžaduje požiadavka spätného posúdenia v zmysle klasifikácie krutosti vykonávaných postupov.

Netechnické zhrnutie projektu**Názov projektu:**

Vazoaktívne účinky sulfidovej signalizácie a jej interakcia s oxidom dusnatým v rôznych animálnych modeloch metabolického syndrómu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3888/18-221/3

Kľúčové slová: metabolický syndróm, oxid dusnatý, sírovodík, WKY, SHR

Účel projektu: Základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodených stavov zvierat alebo ich účinkov na zvieratá, stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov zvierat.

Oxid dusnatý (NO) a sírovodík (H₂S) patria medzi významné plynné signálne molekuly, ktoré sa zapájajú do regulácie cievneho tonusu. Ich syntéza prebieha v rámci cievnej steny pomocou rôznych enzýmov a zároveň sa potvrdil zásah oboch molekúl nielen do fyziologických (relaxácia hladkej svaloviny) ale aj do patologických procesov (hypertenzia, diabetes mellitus, ateroskleróza, zápal). Metabolický syndróm (MS) predstavuje skupinu abnormalít, vrátane obezity, hypertenzie, hyperinzulinémie, hyperlipidémie, ktoré spolu zvyšujú riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení. Doterajší výskum H₂S signalizácie a jej interakcie s NO bol zameraný najmä na normotenzné podmienky, avšak informácie o ich úlohe v etiopatogenéze MS nie sú známe. Cieľom projektu je charakterizovať vazomotorickú úlohu týchto dvoch plynných transmitterov a ich vzájomnú interakciu v rôznych modeloch MS: indukovaného vysokofruktózovou diétou a vysokotukovou diétou v podmienkach normotenzie a primárnej hypertenzie.

Prínos projektu

Vzájomné prepojenie systémov H₂S-NO/NOS v etiopatogenéze metabolického syndrómu (MS) sledované nebolo, čo nadobúda význam najmä vzhľadom na skutočnosť, že spustenie takého komplikovaného patologického procesu ako je MS nie je závislé od zlyhania len jednej signálnej dráhy. Hlavným cieľom experimentov je cestou objasňovania mechanizmov a účinku NO, H₂S a ďalších regulačných systémov a ich vzájomných interakcií preventívne predchádzať kardiovaskulárnym chorobám.

V projekte navrhnuté metodologické postupy zabezpečia komplexný uhol pohľadu na danú problematiku – od molekulárnej úrovne po komplexnú odpoveď kardiovaskulárneho systému – čo je zárukou na efektívne splnenie deklarovaných cieľov.

V jednotlivých krokoch očakávame nové informácie, ktoré:

- i. prispejú k objasneniu mechanizmov účinkov NO a H₂S signálnych dráh v podmienkach MS in vitro aj in vivo,

- ii. prispieť k objasneniu mechanizmov účinkov interakcie NO a H₂S signálnych dráh v podmienkach MS in vitro aj in vivo,

prispieť k objasneniu úlohy jednotlivých častí cievnej steny (endotel, perivaskulárne tukové tkanivo, hladké svalové bunky, perivaskulárne nervy).

Počet a druh zvierat

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*) kmeň:

Wistar Kyoto (WKY): 96 ks

Spontánne hypertenzný potkan (SHR): 96 ks

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

Krvný tlak budeme merať neinvazívnym spôsobom na chvoste pomocou manžety, tzv. pletyzmografickou metódou. Počas merania potkany budú umiestnené v meracej komôrke, kde bude čiastočne obmedzený ich pohyb, ale nebudú imobilizované (mierny stres, slabá krutosť). Táto metóda môže byť spojená s krátkodobým miernym stresom, ktorý sa po opakovaných meraniach znižuje. Metóda nenarušuje integritu potkana a bude sa prevádzkať pri plnom vedomí potkana, pričom zvieratá nebudú vystavené bolesti.

V in vivo experimentoch sa použijú postupy, ktoré sa celé vykonávajú v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie. Potkanom bude zavedená kanyla do karotickej artérie na meranie krvného tlaku a druhá kanyla do jugulárnej vény slúžiaca na podávanie farmák. Počas experimentu bude podľa potreby (sledovanie záznamu tlaku krvi a správanie zvierat) v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. V týchto postupoch je takto zabezpečené, aby zvieratá nepociťovali bolesť. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. Pri in vitro postupoch zvieratá budú znecitlivnené celkovou anestéziou do hlbokého bezvedomia účinkom oxidu uhličitého (CO₂) - slabá krutosť. Pri znecitlivnení budú zvieratá umiestnené do špeciálne konštruovaných komôr až po dosiahnutí najvyššej možnej koncentrácie oxidu uhličitého v komore privádzaného zo zdroja 100%-ého CO₂ tak, aby sa vylúčilo poranenie zvierat a bolo možné ich vidieť. Pri oboch postupoch navrhujeme kategóriu krutosti: bez možnosti zotavenia.

Chronická aplikácia látok sa uskutoční buď perorálne (v pitnej vode, v strave – dlhodobý mierny stres a mierna bolesť, stredná krutosť) alebo intraperitoneálne (vo fyziologickom roztoku). Počas intraperitoneálnej aplikácie látok zvieratá budú krátkodobo fixované, čo predstavuje metódu vyvolávajúcu len mierny krátkodobý stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu zvierat (slabá krutosť, trvanie 1 minúta).

Predpokladaná úroveň krutosti

Slabá krutosť:

- rutinná starostlivosť a váženie, neinvazívne meranie krvného tlaku a frekvencie srdca

- in vitro experiment - - bež možnosti zotavenia,
- in vivo experiment - intraperitoneálne podanie celkovej anestézy, na konci experimentu usmrtenie aplikáciou letálnej dávky anestetika - bez možnosti zotavenia.

Stredná krutosť:

- chronická aplikácia látok - perorálne v pitnej vode – aplikácia 10% roztoku fruktózy počas 8 týždňov, perorálne v krmive – aplikácia vysokotukovej diéty, intraperitoneálne – aplikácia H₂S donora počas 4 týždňov.

Navrhnuté modely a postupy samostatne už boli otestované na našom ústave, ako model vplyvu zmeny zloženia pitnej vody a krmiva na kardiovaskulárny systém (Zemančíková a Török, 2014; Zemančíková a Török, 2017) tak aj intraperitoneálne podávanie látky zasahujúcej do endogénnej signalizácie H₂S (Kristek a spol., 2014). Počas týchto experimentov sa nepozoroval žiadny negatívny vplyv (stres, zhoršenie zdravotného stavu) modelu na experimentálne zvieratá.

Kristek F., Drobná M., Berényiová A, Ondriáš K.. The long-term effect of hydrogen sulphide deficiency on general parameters and structure of cardiovascular system of Wistar rats. In Nitric Oxide : Biology and Chemistry. - San Diego, USA : Academic Press Inc Elsevier Science, 2014, vol. 39, supplement 1, p. S17.

Počas chronickej aplikácie látok budeme vykonávať klinické pozorovania zaznamenané do hárkov, podľa ktorých posudzujeme zdravotný stav a pohodu zvierat. Vypracujeme bodové skóre, na základe ktorého, podľa priradeného počtu bodov v jednotlivých sledovaných parametroch, budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom vyradené (human end point) alebo liečené a ďalej použité v experimentoch. Parametre bododovacieho skóre:

- celkový vzhľad experimentálnych zvierat: telesný stav (úbytok/prírastok hmotnosti), stav srsti a kože (prítomnosť čistenia, strata ochlpenia, opuch, chrasta, vred), prítomnosť výtoku (z očí, z nosa), vzhľad očí (zatvorené/polozatvorené), prítomnosť slinenia a anomálie zhryzu,
- telesné funkcie: dýchanie, príjem potravy a tekutiny,
- sociálne interakcie zvierat (agresívne interakcie), držanie tela a pohyblivosť (krívanie, nekoordinovaný pohyb, tras, záchvaty),
- chovné prostredie zvierat (prítomnosť a hustota stolice, prítomnosť alebo krvi).

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

Pri jednotlivých zárokoch in vivo experimentu zvieratá môžu pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach a použité postupy môžu slabo narušiť pohodu a celkový stav zvierat

In vivo experiment - počas experimentu sa po intraperitoneálnom podaní celkovej anestézy v bezvedomí zavedú 2 katétre - jeden intravenózne na podávanie látok a jeden intraarteriálne na zavedenie sondy, tlakomeru, katétre a podávané farmaká môžu spôsobiť diskomfort, bezvedomie však bude po celý čas kontrolované a v prípade potreby sa podá anestetikum.

Chronická aplikácia látok – počas experimentu sa budú počas 8 týždňov aplikovať v pitnej vode alebo intraperitoneálne látky, podávané farmaká môžu spôsobiť diskomfort, budeme

kontrolovať bodovacie skóre a postupovať podľa odporúčení veterinára (podanie analgetík, antibiotík a pod.), pri intraperitoneálnom podávaní látok sa môže vyskytnúť zápal v mieste vpichu, čo ošetríme podaním antibiotík, každodenným pozorovaním a starostivosťou o rany.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obnedenia a zjemnenia

1. Nahradenie zvierat: Cieľom plánovaného pokusu je odhaliť účasť resp. podiel špecifického regulačného mechanizmu v etiopatogenéze metabolického syndrómu. Pre sledovanie funkcie kardiovaskulárneho systému s hlavným zreteľom na reguláciu krvného tlaku a rozvoj hypertenzie je najvhodnejší model laboratórneho potkana. Zatiaľ neexistuje alternatívna metóda, ktorá by nahradila laboratórneho potkana. Dokumentuje to príloha Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód.

2. Redukcia počtu zvierat: V plánovanom experimente je zabezpečený čo najnižší počet experimentálnych zvierat, tak aby bol experiment štatisticky vyhodnotiteľný a závery všeobecne prijateľné. Zabezpečí sa, aby nedochádzalo k duplicite kontrolných skupín. Zvieratám použitým na in vitro experiment sa odoberie maximálne množstvo vzoriek na sledovanie fyziologických, biochemických prípadne histochemických parametrov. Jednotlivé skupiny bude tvoriť najnižší možný počet jedincov. V rámci in vitro experimentu bude sledovaný program spoločného využívania orgánov a tkanív usmrtených zvierat v rámci CEM, o.z. ÚNPF SAV, čo v prípade dostupnosti umožní získať potrebné orgány a tkanivá aj z iných schválených projektov ústavu a zabráni ďalšiemu navyšovaniu zvierat v týchto skupinách. Zároveň budú prostredníctvom styčných pracovníkov informované aj statné organizačné zložky CEM SAV o možnosti spoločného využívania orgánov.

3. Zjemnenie: Pre dosiahnutie vedeckých cieľov projektu je najvhodnejší laboratórny potkan, ktorý predstavuje druh, ktorému navrhnuté postupy spôsobia minimálne utrpenie a strach. U skupiny zvierat, kde sa uskutoční meranie tlaku krvi invazívnym spôsobom bude intraperitoneálne aplikovaná anestéza. Počas experimentu bude podľa potreby v príslušných časových intervaloch aplikovaná intraperitoneálne dávka anestetika. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené aplikáciou letálnej dávky anestetika. U skupiny zvierat, kde budú sledované fyziologické parametre na izolovaných cievach potkana a súčasne budú odobraté potrebné orgány pre stanovovanie biochemických parametrov, budú zvieratá humanne utratené. Najskôr sa vystavia pôsobeniu oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, nechajú sa vykrvácať a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné cievy a orgány. Počas chronickej intraperitoneálnej aplikácie látok sa bude pravidelne sledovať, či nedochádza k zápalovej reakcii v miestach vpichu injekcie. V prípade prítomnosti zápalu sa použije liečba antibiotikami. Počas chronického treatmentu budeme vykonávať klinické pozorovania zaznamenané do hárkov, podľa ktorých posudzujeme zdravotný stav a pohodu zvierat. Na základe dosiahnutého skóre bodov budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom vyradené (human end point) alebo liečené a ďalej použité v experimentoch. V prípade zistenia akejkoľvek formy utrpenia budeme postupovať podľa odporúčení veterinárneho lekára (podanie analgetík, antibiotík a pod.). Po podaní injekcie sa zvieratá budú monitorovať. Ak sa spozoruje väčšia ako stredná prechodná bolesť alebo strach, zvieratá sa humanne usmrčia.

Postupy chovu prispôsobíme tak, aby sa minimalizovalo riziko kontaminácie. Zvieratá budú mať dostatočne obohatené prostredie, aby sa znížil stres. V prípade úbytku hmotnosti bude zabezpečené podanie vysokoenergetických potravinových doplnkov (úbytok hmotnosti nesmie prekročiť 20%).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: **nie**

Názov projektu: Napäťovo riadené sodíkové kanály ako cieľové molekuly na inhalačnú terapiu excesívneho kašľa.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3900/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): Kašeľ, napäťovo riadené sodíkové kanály, C-vlákná, inhalačná terapia

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Perzistentný, dráždivý kašeľ spojený s chronickými respiračnými ochoreniami zhoršuje respiračnú funkciu, zvyšuje morbiditu a ďalej oslabuje kvalitu života. U týchto pacientov lokálne pôsobiace (inhalačné) látky by mohli inhibovať nervy vyvolávajúce kašeľ. Napäťovo riadené sodíkové kanály (NaVs) majú zásadný význam pri iniciácii akčných potenciálov nervových terminálov vyvolávajúcich kašeľ. Súčasné poznatky z neurobiológie umožňujú považovať NaVs za veľmi sľubné terapeutické ciele.

Neproduktívny kašeľ je spúšťaný C-vláknami dýchacích ciest. Na druhej strane, kašeľ, ktorý chráni respiračný systém pred aspiráciou, je spúšťaný Ad-vláknami. Preto je žiaduce inhibovať najmä C-vlákná dýchacích ciest, ale nie Ad-vlákná. Nedávna štúdia ukázala, že aktivácia akčných potenciálov C-vláknien dýchacích ciest závisí od NaV1.8 a aktivácia Ad-vláknien je závislá na NaV1.7.

Preto predpokladáme, že inhibícia NaV1.8 bude inhibovať kašeľ sprostredkovaný C-vláknami, ale ušetrí protektívny kašeľ vyvolaný pri aspirácii. Uvedenú hypotézu budeme študovať kombináciou štúdií kašľového reflexu, elektrofyziologickými a molekulárnymi metódami v modeli zdravých morčiat a v modeli alergického zápalu dýchacích ciest.

1.cieľ – vyhodnotiť efekt lokálne (inhalačne) podávaných selektívnych blokátorov napäťovo riadených sodíkových kanálov NaV1.8 a NaV1.7 na kašeľ sprostredkovaný cez C-vlákná a Ad-vlákná v modeli zdravých (naïve) morčiat (chemicky a mechanicky indukovaný kašeľ)

2.cieľ – vytvoriť model alergického zápalu dýchacích ciest. V tomto modeli budeme hodnotiť zápalom indukované zmeny v expresii podjednotiek NaVs v C-vláknach a A δ -vláknach v dýchacích cestách metódou scRT-PCR.

3.cieľ – v modeli alergického zápalu pľúc budeme hodnotiť funkčné zmeny sodíkových kanálov (NaVs) v aktivácii akčných potenciálov v elektrofyziologických štúdiách a farmakologických štúdiách kašľového reflexu stimulovaného cez C a Ad-vlákná (chemicky a mechanicky indukovaný kašeľ)

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

Očakávame, že uskutočnením týchto štúdií prispejeme po 1-krát k významnému pochopeniu úlohy NaV1.8 pre kašeľ mediovaný C-vláknami a prispejeme k pochopeniu úlohy NaV1.7 pre protektívny kašeľ – kašeľ s obranným mechanizmom, ktorý je mediovaný Ad-vláknami.

Taktiež po 1-krát vyhodnotíme úlohu NaVs vo validovanom modeli alergického zápalu dýchacích ciest, špecificky zmeny v expresii NaVs v aferentných Ad- a C-vláknach, zmeny v produkcii akčných potenciálov oboch typov vláknien a zmeny ich funkcie v Ad- a C-vláknach sprostredkujúcich kašeľ počas zápalu.

Očakávame, že našimi výsledkami prispejeme k stimulácii farmakologického vývoja selektívnych inhibítorov NaV1.8 a ku klinickým štúdiám inhalačných inhibítorov NaV1.8 pre liečbu

excesívneho perzistentného kašľa u pacientov s chronickými respiračnými ochoreniami a u pacientov s chronickým protrahujúcim kašľom z iných príčin. Pretože len správne pochopenie príčin a patofyziológie protrahovaného kašľa môže viesť k vývoju nových diagnostických a liečebných postupov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Morča domáce, Dunkin Hartley, samce, predbežne 288/4roky

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

Metodické postupy (vyšetrenie kašľového reflexu), ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh, u senzitívnejších zvierat počas inhalácie môže byť prítomná prechodne zvýšená sekrécia z nosa alebo slinenie, po ukončení 5-minutovej inhalácie zvieratá sa dostávajú do normálu.

Metodika senzibilizácie morčiat je veľmi dobre tolerovaná. Plánovaný projekt je minimálne traumatizujúci v zmysle senzibilizácie (injekcia ovalbumínu) a krátkodobej inhalácie alergénu (ovalbumín). V snahe vyhnúť sa novej anafylaktickej reakcii, zvieratá sú premedikované antihistaminikom pred inhaláciou alergénu. Počas inhalácie v plastických boxoch je pozorovaná individuálna variabilita, u niektorých morčiat môže byť pozorované prechodne zrýchlené dýchanie, prípadne mierne zvýšená sekrécia z nosa a/alebo slinenie, ktoré po ukončení inhalácie cca 5 min sa upraví do normálu.

Pri použití metodiky retrográdneho značenia neurónov inervujúcich dýchacie cesty sa zvieratám v krátkodobej anestéze vykoná veľmi šetrný minimálny chirurgický zákrok, po prebudení rýchlo nastupuje motorická aktivita a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. Zvieratá budú udržiavané vo zverinci s najväčšou starostlivosťou do dvoch týždňov. Podľa protokolu a časového harmonogramu budú zvieratá usmrtené vykrvácانím po predchádzajúcej anestézii uretan alebo zoletil (predávkovaním anestetika), prípadne inhaláciou CO₂ a v štúdiách sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom.

Zhoršený zdravotný stav očakávame výnimočne u senzitívnych – precitlivých zvierat, alebo u zvierat s primárne zhoršeným zdravotným stavom. Štúdie sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie pokusných zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov, ktoré môžu pozitívne obohatiť farmakoterapiu. Veľká pozornosť bude zameraná na adaptáciu s personálom a laboratórnym prostredím.

Predpokladaná celková úroveň krutosti: Stredná

Počas postupu budú všetky zákroky na zvieratách vykonávať iba oprávnené osoby so vzdelaním primeraným charakteru tejto práce. Týždeň pred vykonávaním čiastkových experimentov zvieratá budú adaptované na laboratórne podmienky a personál v snahe vylúčiť stresové správanie.

Vyvolané patologické stavy v modeli alergického zápalu trvajú krátkodobo, sú viazané na dobu cca 15 min po inhalačnom podaní alergénu v 3 nasledujúcich dávkach, mimo laboratória zvieratá netrpia žiadnym patologickým procesom, sú klinicky zdravé, umiestnené v centrálnom zverinci. V nasledujúcich vyšetrovaníach kašľovej odpovede sú zvieratá umiestnené v bodypletyzmografe a 10min exponované inhibítorom sodíkových kanálov (tento stimul je neškodný a nie je bolestivý) a následne 5min sú exponované tusigénu spolu s inhibítorom – tu očakávame inhibičný účinok. V tomto prípade patologický stav trvá 5 min a po vybratí zvieratá z bodypletyzmografu tento stav odoznieva do 5-10min.

Pred začiatkom každého čiastkového postupu budú zvieratá po premiestnení z centrálného zverinca aklimatizované na podmienky prostredia v laboratóriu (min. 30 min pred začiatkom experimentu).

Adaptácia na laboratórne podmienky

Slabá – váženie, značenie zvierat, presun z centrálneho zverinca do užívateľského zariadenia, adaptácia na bodypletyzomograf, na personál

Vyšetrenie chemicky-indukovaného kašľa u bdelých morčiat:

Stredná – opakovaná inhalácia aerosólov, ktorá nie je bolestivá, avšak vyvoláva kašeľ (priemerne 10 kašľov za 10 minút) predpokladáme, že zvieratá budú pociťovať strach a diskomfort spojený s pobytom v komore pletyzmografu, hoci sa na tento stav vopred adaptujú (v prípravnej fáze postupov). Predpokladáme, že zvieratá nebudú mať závažne narušenú pohodu ani celkový zdravotný stav.

Bdelé zvieratá sú umiestnené v bodypletyzmoграfe celkovo 15 minút. Prvých 10 min inhalujú neškodnú látku – fyziologický roztok + vehikulum/inhibitor, ďalších 5 minút nízku koncentráciu tusigénnej látky. Niektoré zvieratá reagujú bez nejakých klinických zmien, u niektorých sa vyvíja klinický stav spojený s miernou sekréciou z nosa, slinením a zvýšenou frekvenciou dýchania. Počet zakašľaní u kontrolných zvierat je zvyčajne 5 – 8, po predliečení inhibítorom očakávame pokles zakašľaní na napr. 2 – 4. Tento stav spojený s diskomfortom trvá krátkodobo 5min počas expozície, po ukončení expozície sa klinický stav dostáva do normálu veľmi rýchlo od 3min-10min.

Modelovanie alergického zápalu

Stredná – zvieratá sú senzibilizované ovalbumínom opakovanými 3 interpleurálnymi injekciami ovalbumínu. Po 3 týždňoch budú inhalačne exponované aerosólu ovalbumínu max do 5 min a budú predliečené anitihistaminikom s cieľom vyhnúť sa nožnej bolestivej bronchokonstrikčnej odpovedi. V tomto prípade ide o krátkodobý diskomfort počas expozície. Zo skúsenosti je známe, že zvieratá nebudú mať závažne narušenú pohodu ani celkový zdravotný stav.

Pri senzibilizácii počas intraperitoneálneho podávania alergénu nepozorujeme žiadne klinické zmeny. Počas 5-min. inhalácie alergénu po 3 týždňoch od poslednej injekcie u zvierat sú pozorované prejavy alergickej reakcie – mierne zvýšená sekrécia z nosa a/alebo slinenie, zvýšená frekvencia dýchania, niekedy pozorované sťažené dýchanie. Tento stav sa v priemere začína objavovať po 2-3 min od začiatku inhalácie. Po ukončení inhalácie sa klinický stav upravuje veľmi rýchlo a navracia sa späť do normálu. Vo zverinci nepozorujeme prejavy klinických zmien, spomínaný klinický stav je pozorovaný len krátkodobo – nevyhnutný čas v laboratórnych podmienkach.

Vyšetrenie mechanicky-indukovaného kašľa u anestézovaných morčiat:

Bez možnosti zotavenia – u anestézovaných zvierat sa po sprístupnení laryngu a trachey zavedie kanyla do trachey pri 7-8 prstenci, čím sa zabezpečí spontánne dýchanie, kašeľ sa evokuje mechanickou stimuláciou tracheobronchiálnej oblasti nylonovým vláknom zasúvaním cez tracheálnu kanylu v blízkosti kariny.

Bez možnosti zotavenia – po ukončení experimentu je zviera usmrtené predávkovaním anestetika.

Metóda retrográdneho značenia neurónov a single cell RT-PCR:

Stredná – retrográdne značenie neurónov inervujúcich tracheu – malý chirurgický zákrok v krátkodobej anestézii (cca 1 cm kožná incízia v krčnej oblasti na exponovanie pažeráka a injekcia Dil do steny pažeráka v mikro-množstvách). Zo skúsenosti je známe, že zvieratá už po hodine sú čulé s dobrou motorickou aktivitou a príjmom potravy a tekutín. Za 2-3 dni je rana zahojená.

Bez možnosti zotavenia – zvieratá pre nasledujúce metodiky *single cell* RT-PCR budú usmrtené inhaláciou CO₂ a potom sa už pracuje len s tkanivom.

Elektrofyzologické experimenty:

Bez možnosti zotavenia – zvieratá budú usmrtené inhaláciou CO₂ a potom sa už pracuje len s inervovaným preparátom dýchacích ciest.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie

Experiment nie je možné vykonať bez použitia relevantných zvierat. Morča domáce je jeden z najrelevantnejších modelov aferentnej inervácie dýchacích ciest a pľúc vo vzťahu ku kašľu. Neurofyzologické a neurofarmakologické parametre u morčiat sú ideálne pre vykonanie translačných štúdií s validáciou dát priamo u človeka. Pri tomto plánovanom pokuse neexistujú alternatívne metódy, pretože na tento projekt nie je možné použiť nižší druh laboratórnych zvierat (napr. myš, potkan, pretože tieto nemajú vyvinutý kašľový reflex, prehľadne spracované v „Mazzone, S.B., Undem, B.J. (2009). Cough sensors. V. Pharmacological modulation of cough sensors. Handb Exp Pharmacol. (187): 99-127“). Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na komplexnosť jednotlivých typov aferentných vágových dráh nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.).

2. Redukcia

Jednotlivé experimenty na bdelých a anestézovaných zvieratách budú vykonané na najnižšom počte jedincov tak, aby bol výsledok experimentu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z experimentu relevantné v snahe vyhnúť sa riziku falošne negatívnych alebo pozitívnych výsledkov. Ak v čiastkových experimentoch priebežnou štatistickou analýzou dosiahneme relevantné výsledky, budeme znižovať plánovaný počet zvierat.

3. Zjemnenie

Plánované experimenty sú minimálne traumatizujúce pre zvieratá.

Chemicky-indukovaný kašeľ - bdelé zvieratá sú umiestňované do dvojkomorového pletyzmografu, kde inhalujú aerosól tusigénnej látky a testovanej látky (inhibítory NaVs). Tento postup zvieratá znášajú pokojne, keďže sú na podmienky experimentu a laboratórium adaptované. Adaptácia slúži na minimalizovanie stresovej reakcie a prebieha vždy pred začatím každého pokusu. Pri adaptácii sa zvieratá minimálne 2 krát exponujú aerosólu pufrovaného fyziologického roztoku (PBS), aby si zvykli na pobyt v pletyzmografe. Inhalácia aerosólu a pobyt v pletyzmografe nespôsobujú zvieratám bolesť. Počas experimentu je zabezpečené welfare zvierat.

Aj keď v názve projektu je excesívny kašeľ, ktorý vychádza z klinických štúdií u pacientov, našim zámerom nie je vyvolať excesívny kašeľ u morčiat, preto používame prahové (najnižšie) koncentrácie tusigénnych látok, ktoré vyvolajú napr. 6 zakašľaní a našim úspechom bude, keď po podaní inhibítora zvieratá zareagujú napr. 2 zakašľaniami. Tým sa výrazne odlišujeme od iných zahraničných výskumných pracovníkov v tejto oblasti. Z praktických skúseností môžem potvrdiť, že zvieratá môžu mať diskomfort len počas 5 minút expozície tusigénnej látky. Po ukončení expozície, klinický stav sa dostáva do normálu v krátkej dobe od 5 do 10 minút, zdravotný stav vo všeobecnosti sa nezhoršuje, klinický stav pozorovaný vo zverinci je v norme. (zjemnenie – použitie najnižšej prahovej koncentrácie, ktorá môže vyvolať kašeľ).

Mechanicky-indukovaný kašeľ - anestézované zvieratá sú umiestňované v polohe na chrbte na vyhrievanej podložke, do trachey sa zavedie kanyla aby bolo zabezpečené spontánne dýchanie zvierat. Následne sa evokuje kašeľ mechanickou stimuláciou tracheobronchiálnej oblasti nylonovým vláknom (0,3 mm) zasúvaním cez kanylu v blízkosti kariny. Inhibítory NaVs budú aplikované do trachey vo forme aerosólu. Počas experimentu je zabezpečený komfort zvierat, minimálna manipulácia a zvieratá sú len minimálne traumatizované.

Retrográdne značenie neurónov - v krátkodobej anestézii sa exponuje krčná časť trachey a cez anteriálnu stenu sa injektuje do dorzálny steny retrográdny tracer Dil (0,1 %) do 2-3 miest (v

celkovom objeme 10 μ l). Kožný rez zvieratá je minimálny, je zabezpečené rýchle hojenie, takže zvieratá nie sú traumatizované a prípadná bolesť je len minimálna. Podľa protokolu a časového harmonogramu pred použitím metodiky single cell RT-PCR budú zvieratá usmrtené inhaláciou CO₂ a v experimente sa bude ďalej pracovať už len s tkanivom (vágové aferentné gangliá).

Elektrofyziológické štúdie – tu sa budú používať inervované preparáty dýchacích ciest morčatá. Na tento účel sa zvieratá usmrtia inhaláciou CO₂.

Model alergického zápalu – zvieratá budú senzibilizované ovalbumínom opakovanými 3 interpleurálnymi injekciami ovalbumínu (10mg/kg) v 48-hod. intervaloch. Po 21 dňoch sa vyvíja kompletná alergická odpoveď. Zvieratá potom inhalujú nebulizovaný ovalbumín (10mg/ml, 5 min) 3krát každý druhý deň (predliečba nízkou dávkou antihistaminika – pyrilamin (1mg/kg) 20 min pred inhaláciou v snahe predísť prípadnej anafylaktickej reakcii).

V prípade modelu alergického zápalu, použitá senzibilizácia je najjemnejšia, nám nejde o vyvolanie chronického silného systémového zápalu, nami vyvolaný zápal je mierny. Zvieratá budú pociťovať diskomfort počas 5 minút, aby sme sa vyhli anafylaktickej reakcii, zvieratám bude podané anihistaminiku a to je zjemnenie. Očakávame, že kašľová odpoveď môže byť vyššia, ale znovu len počas stimulácie trvajúcej 5 minút. V prípade, ak by senzitivne zviera zareagovalo abnormálne zvýšenou odpoveďou – bronchokonstrikciou, preventívne máme k dispozícii bronchodilatans – Ventolin, ktorý v prípade potreby podáme.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

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

Názov projektu: „Biovyužitelnosť zinku u hospodárskych zvierat – možnosti a riešenia“

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4065/18-221/3

Kľúčové slová v projekte: zinok, metabolizmus, rastlinné nutraceutiká, fytáza, hospodárske zvieratá

Účel projektu:

Popísaný postup bude vykonaný na účely základného výskumu. Preto by jeho kľúčovým prínosom malo byť získanie lepších a detailnejších znalostí o biovyužitelnosti zinku z jeho rôznych, prevažne organických zdrojov, používaných ako krmné aditíva vo výžive zvierat. Zároveň získame nové základné poznatky o vplyve herbálnych nutraceutík na metabolizmus mikroelementov, gastro-intestinálne procesy a antioxidačný status u prežúvavcov a monogastrických zvierat. Naším zámerom bude zvýšiť možnosti efektívneho používania minerálnych aditív vo výžive zvierat a prispieť tak k zníženiu negatívneho dopadu živočíšnej výroby na životné prostredie.

Ciele projektu:

Hlavné ciele nami navrhovaného projektu sa dajú zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. Hodnotenie biovyužitelnosti zinku z jeho organických alebo anorganických zdrojov pridávaných do diét prežúvavcov a hydiny.
2. Testovanie účinku herbálnych nutraceutík na minerálny metabolizmus a gastrointestinálne procesy u oviec suplementovaných organickou formou zinku.
3. Posúdenie antioxidačnej odpovede zvierat na príjem herbálnych nutraceutík v kombinácii s prídavkom organického zdroja zinku.
4. Sledovať dopad aplikácie exogénnej fytázy v diéte na biovyužitelnosť zinku z jeho anorganického a organického zdroja u nosníc.

Naším cieľom je nájsť vhodný prístup, ktorým by sa zvýšila a stabilizovala dostupnosť zinku z krmiva a súčasne by sa mohlo znížiť jeho celkové množstvo v krmive. Originálnosť projektu spočíva v testovaní správnej kombinácie zmesi liečivých rastlín a organických zdrojov zinku, ktoré doteraz neboli spolu kombinované a testované pri prežúvavcoch.

Prínos z vykonaného projektu:

Výskum aplikácií rôznych zdrojov Zn do výživy zvierat by mohlo priniesť nové základné informácie o metabolizme a depozícii Zn v tkanivách zvierat. Navyše, hodnotenie minerálneho statusu zvierat pri rôznych nutričných podmienkach ovplyvňujúcich biovyužitelnosť stopových prvkov by mohlo priniesť nové základné informácie v tejto oblasti. Získané nové poznatky by mohli prispieť, na vedeckom základe, k redukcii všeobecne rozšíreného používania Zn v diétach, čo by však nemalo obmedziť zdravie a úžitkovosť zvierat, ale malo by znížiť negatívny dopad živočíšnej produkcie na životné prostredie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Použitie oviec, nosníc a brojlerových kurčiat v pripravovanom pokuse je opodstatnené, keďže jedným z hlavných cieľov je porovnať biovyužitelnosť zinku u prežúvavcov a monogastrických zvierat pri rôznych nutričných podmienkach (fytaditíva, exogénna fytáza). Pokusné zvieratá budú pochádzať zo schválených chovných zariadení.

V pokusoch plánujeme použiť nasledovné druhy zvierat:

Kurčatá nosivého typu/Nosnice: Lohmann Brown resp. Isa Brown - predbežný počet spolu: 220 jedincov.

Kurčatá výkrmové/Ross 308 - predbežný počet spolu: 220 jedincov.

Ovce/Zošľachtená Valaška – predbežný počet spolu: 56 jedincov

Pri zohľadnení všetkých potrieb vedeckého výskumu i predpisov stanovených v nariadení vlády 377/2012 Z.z. maximálny počet použitých zvierat za celé obdobie trvania projektu (01.03.2019-28.02.2022) nepresiahne hore uvedený počet zvierat daného druhu, keďže takéto množstvo je postačujúce na zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia získaných výsledkov.

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

Nepriaznivý vplyv na použité zvieratá nepredpokladáme. Pokusy sú zostavené tak, aby sa minimalizovala bolesť alebo stres a aby bol zabezpečený a dodržiavaný welfare. Kurčatá budú umiestnené do koterco (s plochou 2 m²) s vysokou podstielkou z drevených hoblín, ktorá sa im denne vymieňa. Počet kurčiat v skupine sa upraví podľa hmotnosti vtákov s požiadavky na minimálnu plochu pre jedného vtáka. Chov nosníc bude v moderných, obohatených klietkach, ktoré vyhovujú požiadavkám predpisov EÚ a sú riešené tak, aby spĺňali všetky ich potreby správania. Pre každú nosnicu bude zabezpečený podlahový priestor najmenej 900 cm², prísun vody v klietke je zabezpečený prostredníctvom dvoch kvapkových napájačiek a všetky klietky sú obohatené primerane k vekovej kategórii zvierat. Bude sa dbať na predpísané zootechnické podmienky ich chovu (teplota, vlhkosť, plocha/vták a pod). Voda a krmivo budú k dispozícii *ad libitum* a zootechnické podmienky chovu (teplota a vlhkosť vzduchu) budú dodržiavané podľa technologického postupu pre chov daného plemena zvierat. Ovce budú počas experimentu ustajnené individuálne v kotercoch (výška 120 cm, podlahová plocha 2,06 m²) s vyhovujúcimi rozmermi a priestorovými podmienkami, pri dodržiavaní príslušných zootechnických podmienok a budú kŕmené 2 x denne pri voľnom prístupe k vode počas celého pokusu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Všetky postupy vykonávané v rámci pokusov (príjem diét suplementovaných minerálnymi a rastlinnými aditívami, **manipulácia so zvieratami, váženie**) spadajú podľa prílohy 4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. do kategórie krutosti postupov „slabé“, čo znamená, že zvieratá v ich dôsledku nebudú pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach.

Počas pokusu sa bude zvieratám (ovciam) podľa harmonogramu odoberať krv (maximálne 3 krát počas celého experimentu) z jugulárnej veny pre za účelom monitorovania hematologického a minerálneho profilu zvierat, čím sa zistí účinnosť podávania príslušného aditíva ako aj celkový zdravotný stav zvierat. Opakované odbery krvi z jugulárnej veny môžu byť spojené s krátkodobou strednou bolesťou a stresom v dôsledku krátkodobej imobilizácií zvierat (max. 1 minúta), čo môžeme zaradiť do kategórie krutosti „stredné“.

Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení a budú dbať na humánny prístup k zvieratám a starať sa o to, aby neboli v žiadnej fáze pokusov vystavované zbytočnému stresu. Navrhnuté spôsoby usmrčovania zvierat (dekapitácia a usmrtenie nadmernou dávkou anestetika) sú v súlade s § 5 a prílohou č. 2 NV 377/2012 Z.z.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Na tento typ pokusu je potrebné použiť zvieratá – prežúvavca (ovcu), hydinu. Tento typ experimentu nie je možné vykonať v podmienkach *in vitro*. Na dosiahnutie cieľa pokusu neexistuje alternatívna metóda bez použitia zvierat. Keďže cieľom experimentu je sledovať biovyužitelnosť zinku, jeho absorpciu, retenciu, exkrečné cesty a depozíciu do telových tkanív hydiny a prežúvavcov je nevyhnutné podávať zvieratám rôzne zdroje/dávky zinku a fytoaditív do diét zvierat. Zároveň budeme sledovať ich vplyv na metabolické a funkčné procesy tenkého čreva, čo je možné iba v experimentoch na zvieratách. Na dosiahnutie cieľa pokusu neexistuje alternatívna metóda bez použitia odberu materiálu zo živých zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

Uvádzané počty zvierat sú minimálne množstvá potrebné pre preukazné zhodnotenie sledovania stanovených parametrov. V experimentoch na hydine sú nami zvolené počty nevyhnutné z dôvodu vytvorenia viacerých replikátov s určitým počtom zvierat, keďže len z takto organizovaného experimentu je možné získať dostatočné množstvo interpretovateľných a štatisticky preukazných vedeckých výsledkov. Uvedené počty boli nami zvolené preto, aby bolo možné jednotlivé experimenty správne štatisticky vyhodnotiť.

3. Zjemnenie:

V priebehu pokusu nebudú vykonávané bolestivé zákroky na zvieratách a bude s nimi šetrne zaobchádzané. Počas experimentov bude ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu minimálna a odôvodnená vzhľadom k očakávaným výsledkom i s ohľadom na etické aspekty. Experiment je nastavený tak, aby bol minimalizovaný stres použitých pokusných zvierat a aby bola zabezpečená primeraná starostlivosť. Všetci pracovníci, ktorí prichádzajú do styku so zvieratami sú príslušne poučení. Odber vzoriek budú uskutočňovať veterinárni lekári. Osoby zodpovedné za starostlivosť o zvieratá sa riadia pokynmi popísanými v Prevádzkovom poriadku schváleného pokusného zariadenia a sú pravidelne školené. Neustále budeme dbať na humánny prístup k zvieratám. Pokusné zvieratá budú chované v takých podmienkach, ktoré u nich nebudú vyvolávať žiaden stres – zohľadní sa veľkosť kletky/koterca podľa veku zvierat, počet zvierat, svetelný a krmný režim, obohatenie prostredia pre ovce a hydinu a pod. Vo všeobecnosti, uvedené experimentálne postupy nespôsobia nepríjemný diskomfort pokusných zvierat, v podstate sa jedná o štandardné typy pokusov (bežne používané na špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. V dôsledku podávania nami zvolených dávok a zdrojov krmných aditív nehrozí zvieratám žiadne predávkovanie a intoxikácia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

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

Príloha č.2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

"Štúdium vplyvu transplantácie mikrobioty zdravých ľudí a cielenej modulácie mikrobioty ľudí s IBD využitím TWINSHIME u gnotobiotických laboratórnych zvierat asociovaných s humánnou mikrobiotou"

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4043/18-221/3

Kľúčové slová v projekte: animálny model DSS, transplantácia fekálnej mikrobioty, dextran sulfát sodný, kolitída, probiotiká,

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

Opísať ciele projektu:

Cieľom postupu bude vyvinúť bezpečnejší a efektívnejší spôsob manipulácie dysbiotickej mikrobioty získanej od pacientov s IBD, a to jej modifikáciou prostredníctvom prospešných mikroorganizmov, ich kolekcií a účinných naturálnych látok, vrátane prebiotík, polynenasýtených mastných kyselín *in vitro* v Simulátore humánneho črevného mikrobiálneho ekosystému (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem - SHIME). Spätný transfer cielene upravenej autochtónnej mikrobioty pacientov s IBD eliminuje riziká spojené s FMT, a na rozdiel od FMT umožňuje cielejšiu moduláciu šitú na mieru pacienta uplatňujúcu prístup personalizovanej medicíny. Účinnosť transplantácie fekálnej mikrobioty a cielene modulovanej mikrobioty bude overené v experimentoch *in vivo* využitím gnotobiotických myší.

Prínos z vykonaného projektu:

Prínosom projektu je skutočnosť, že sa vytvoria predpoklady pre vývoj nových, zdokonalených prípravkov a produktov, účinnejších výživových doplnkov, prípadne

inovovaných funkčných potravín pre prevenciu a terapiu chorôb. Predpokladané využitie získaných výsledkov nájde svoje uplatnenie v klinickej praxi v zmysle vypracovania postupu cielenej modulácie mikrobioty pacientov s IBD využitím TWINSHIME. Využitie nami navrhnutého postupu umožní cieľnú moduláciu črevnej mikrobioty v prevencii a terapii črevných zápalových chorôb, pričom aplikácia uvedenej metódy nebude spojená s rizikom prenosu patogénnych agens.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe budú použité 4 týždňové myši inbrédneho kmeňa BALB/c samičieho pohlavia. Bude použitých maximálne v I. fáze (animálny model IBD) 126 ks myší, v II. fáze (aplikácia transplantátov) 372 ks myší.

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

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Stupeň krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou zvierat. Bolesť žiadna. Dĺžka úkonu 1-2 min.	Slabý
Perorálna aplikácia (1x denne) fekálnych transplantátov zdravého človeka, pacienta s IBD, upraveného transplantátu v SHIME	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený fixáciou zvierat. Bolesť žiadna. Dĺžka úkonu 1-2 min.	Slabý
Indukcia modelu DSS (Dextran sulfát sodný)	Bolesť žiadna. Aplikácia 1-5% DSS v pitnej vode.	Slabý
Detekcia rektálneho krvácania	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou zvierat s obmedzením pohybu. Bolesť žiadna. Bolesť slabá. Zvieratá môžu pociťovať krátkodobý diskomfort v dôsledku výteru z rekta. Dĺžka úkonu 30 sekúnd.	Slabý
Rozvoj kolitídy v dôsledku príjmu DSS	Po perorálnej aplikácii 1-5% roztoku DSS dochádza u zvierat spravidla na 4 až 5 deň jeho aplikácie k rozvoju symptómov ulceróznej kolitídy, charakterizovanej zápalom kaudálneho úseku tráviaceho traktu (hrubého čreva),	Stredný

	vznikom ulcerácií, krvácania z rekta, výskytom hnačiek, sprevádzané úbytkom celkovej hmotnosti zvierat. Bolest' stredná. Bolest', ktorú touto aplikáciou vyvoláme zjemníme pokojným empatickým zaobchádzaním a kompetentnou manipuláciou počas postupov, poskytnutím ľahko dostupnej potravy a vody (na podlahe kletky), alebo doplnkovej potravy (rozdrvenej).	
<i>Ober krvi zo sinus orbitalis pred ukončením postupu (jednorazový)</i>	Štandardná metóda. Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu. Bolest' slabá, dĺžka úkonu 1,5-2 minúty.	Stredný
<i>Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestéze</i>	Krátkodobý stres spôsobený manipuláciou s obmedzením pohybu. Bolest' vyblokováná znecitlivením.	Slabý

Počas sledovaného obdobia zvieratám nebude zabránené v prirodzenom správaní, vrátane obmedzenia štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť a nebude im vo významnej miere narušaná pohoda ani celkový stav. Na vyvolanie chemickej indukcie IBD sa použije neinvazívny spôsob aplikácie DSS prijímaného vodou, a všetky transplantáty budú aplikované perorálne pomocou inzulinovej striekačky so silikónovou krmnou ihlou. Elastický materiál krmenej ihly ukončenej jemnou manžetkou nespôsobuje poškodenie sliznice dutiny ústnej, a umožňuje bezproblémovú aplikáciu transplantátov po celú dobu postupu (5-10) dní, podľa schémy postupu. Dôsledne bude monitorovaný zdravotný stav zvierat. Najväčšou ujmu pre zvieratá bude negatívny účinok príjmu 1-5% roztoku DSS na sliznicu hrubého čreva u skupín s jeho aplikáciou. Dĺžka trvania postupu je navrhnutá tak, aby sme minimalizovali vystavenie zvierat krutej, alebo dlhotrvajúcej strednej bolesti. Zmiernenie bolesti podávaním analgetík v skupinách s aplikáciou DSS nie je možné, a to z dôvodu ovplyvnenia sledovaných parametrov a naplnenia cieľov projektu.

Human end point:

Manifestácia týchto príznakov:

Úbytok hmotnosti +20 % - skóre 4,

Vodnatá konzistencia trusu - skóre 3,

Masívnym krvácanie z rekta - skóre 3,

bude u zvierat'a predstavovať "human end-point", a následne na základe vedúceho postupu bude humánne usmrtené prípravkom na eutanáziu sodium pentobarbital *i.p.* v dávke 86 mg/kg ž.hm., s následnou cervikálnou dislokáciou.

V skupinách s aplikáciou transplantátu fekálnej mikrobioty (FTM) od zdravého človeka a FTM pacienta s IBD upraveného v SHIME o probiotické mikroorganizmy, a synergicky pôsobiace naturálne bioaktívne látky potencujúce ich efekt, sa očakáva ich protektívny účinok.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

V postupe budú použité 4 týždňové myši inbrédneho kmeňa BALB/c samičieho pohlavia, ktoré sú z hľadiska štúdia požadovaných parametrov najideálnejším modelovým zvierat'om na cieľnú moduláciu črevnej mikrobioty v prevencii a terapii črevných zápalových chorôb. Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo štúdií na zvieratách za tie, ktoré pochádzajú z *in vitro* postupov.

2. Redukcia počtu zvierat:

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet experimentálnych zvierat so snahou o redukciu chýb v priebehu spracovania výsledkov, ako aj na zabezpečenie štatisticky spracovateľných výsledkov. Navrhnutý počet zvierat bol ustanovený na základe súčasných metód v experimentálnom výskume, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat, a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého zvieraťa použitého v postupe.

3. Zjemnenie:

Najväčšou ujmou pre zvieratá bude predovšetkým v I.fáze projektu negatívny účinok príjmu 1-5% roztoku DSS na 4-5 deň jeho aplikácie na sliznicu hrubého čreva u skupín s jeho aplikáciou. Bolesť, ktorú touto aplikáciou vyvoláme zjemníme pokojným empatickým zaobchádzaním a kompetentnou manipuláciou počas postupov, poskytnutím ľahko dostupnej potravy a vody (na podlahe kletky), alebo doplnkovej potravy (rozdrvenej). Zvieratám pri nástupe klinických príznakov zabezpečíme dôkladné klinické monitorovanie s použitím všeobecného hárku na zaznamenávanie klinického skóre so zvýšenou frekvenciou monitorovania. Keď zvieratá dosiahnu vopred stanovené klinické skóre pre humánne ukončenie postupu, humánne sa usmrťia.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno

nie

PRÍLOHA Č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

NÁZOV PROJEKTU:

EXPERIMENTÁLNA ŠTÚDIA PÔSOBNIA MATERSKEJ DEPRESIE A ANTIDEPRESÍVNEJ LIEČBY POČAS GRAVIDITY A LAKTÁCIE NA ZDRAVIE MATKY A VÝVIN POTOMSTVA

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU: 4103/18-221/3

KLÚČOVÉ SLOVÁ: depresia, gravidita, neurobehaviorálny vývin, antidepresíva

ÚČEL PORJEKTU: Základný výskum

CIEĽ PROJEKTU

Cieľom projektu je študovať pôsobenie materskej depresie a/alebo antidepresívnych liekov bupropiónu a mirtazapínu počas gravidity a laktácie na zdravotný stav matky a funkčný vývin mozgu a kardiovaskulárnej sústavy a ďalšie vybrané fyziologické ukazovatele ovplyvneného potomstva potkanov .

PRÍNOS PROJEKTU

Nadobudnuté poznatky môžu prispieť k prehodnoteniu používania antidepresív v klinickej praxi počas tehotenstva a dojčenia v zmysle ich používania alebo nepoužívania. V prípade ich používania môžu byť niektoré konkrétne antidepresíva uprednostnené z hľadiska ich vyššej bezpečnosti pre matku, plod a novorodenca.

POČET A DRUH POUŽITÝCH ZVIERAT

320 zdravých, dospelých, intaktných samíc – (potkan Wistar/DV), iniciálnej hmotnosti 180–200 g a 120 dospelých potkanov - samcov kmeňa Wistar/DV, iniciálnej hmotnosti 220–240 g v rámci 4 rokov trvania projektu. Predpokladaný počet vyšetrených mláďat počas 4 rokov:2400 ks

PREDPOKLADANY NEPRIAZNIVÝ VPLYV/UJMA NA POUŽITÉ ZVIERATÁ V RÁMCI VYKONÁVANIA PROJEKTU

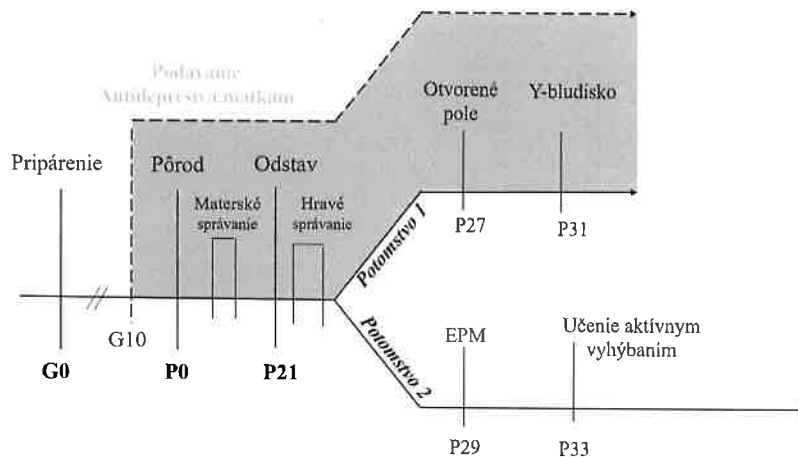
Použité behaviorálne testy nepredstavujú vysoké riziko spojené s bolesťou a stresom. V prípade výskytu závažných nežiaducich príznakov bude postup prerušený. Pri podávaní antidepresív bupropiónu a mirtazapínu nepredpokladáme výskyt komplikácií. Štúdia 6-týždňového podávania bupropiónu (30 mg/kg/deň) a mirtazapínu (10 mg/kg/deň) by nemala mať negatívny vplyv na zmeny hmotností a priberanie potkanov ako všeobecného ukazovateľa nežiaduceho účinku. Preto v tejto časti hovoríme o krutosti slabej.

V rámci chronického nepredvídateľného stresu ani jeden stresor samotný neprekračuje úroveň slabej/strednej krutosti podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády č. 377/2012 Z.z. Avšak z dôvodu opakovania môže byť diskomfort a welfare zvierat zhoršený, čo je aj účelom postupu. Preto po každom stresovom stimule bude zabezpečené aby zvieratá mali aspoň 24 hodín na zotavenie pred ďalším stresovým stimulom. Všeobecnú úroveň krutosti ChNS preto klasifikujeme na strednú.

Použitý postup v rámci modelu chronického nepredvídateľného stresu	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Predátorský stres	Slabá/Stredná
Nútené plávanie	Stredná
Nadpočet zvierat vo vanici	Slabá/Stredná
Mokrý podstielka	Slabá/Stredná
Odobratie potravy	Slabá/Stredná
„Air puff“ stres	Slabá/Stredná

PREDPOKLADANÁ ÚROVEŇ KRUTOSTI modelu chronického nepredvídateľného stresu: STREDNÁ.

POTOMSTVO - MLÁĎATÁ

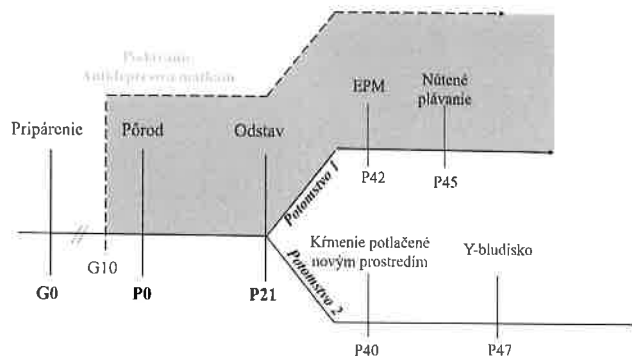


2. etapa

Hodnotenie účinkov materskej depresie a liečby bupropiónom na neurobehaviorálnej a elektrofyziologickej úrovni – Testovanie adolescentného a dospelého potomstva (metodické postupy podrobnejšie opísané v časti metodické postupy)

- Úzkosti podobné správanie u adolescentného potomstva: Kŕmenie potlačené novým prostredím (PP 40), Vyhýšnené bludisko v tvare plus (PP 42), Test núteného plávania (PP 45)
- Kognitívne schopnosti adolescentných potomkov: Y maze (PP 47)
- Zvieratá humane utratíme cervikálnou dislokáciou a následne odoberieme krv a orgány pre ďalšie biochemické, molekulárne a imunohistologické analýzy. (PP 48)

POTOMSTVO – DOSPIEVAJÚCI



- Úzkosti podobné správanie u dospelého potomstva: Kŕmenie potlačené novým prostredím (PP 60), Vyhýšnené bludisko v tvare plus (PP 62), Test núteného plávania (PP 65)
- Kognitívne schopnosti adolescentných potomkov: Y maze (PP 70), Morrisovo vodné bludisko (PP 71-75)
- Meranie krvného tlaku (PP80-90)
- Elektrofyziologické štúdiá in vivo (PP 85-100)
- Zvieratá humane utratíme cervikálnou dislokáciou a následne odoberieme krv a orgány pre ďalšie biochemické, molekulárne a imunohistologické analýzy. (PP 100)

Použitý postup/experiment	Oddiel III – Klasifikácia krutosti postupov
Perorálna aplikácia skúmaných látok	Slabá
Test preferencie sacharózy	Slabá
Materské správanie	Slabá
Hravé správanie	Slabá
Vyvýšené bludisko v tvare plus	Slabá
Exploračné správanie v otvorenom poli	Slabá
Test vynúteného plávania (Porsoltov test)	Stredná
Morrisovo vodné bludisko	Stredná
Učenie aktívnym vyhýbaním	Stredná
Sociálne správanie	Slabá
Krímenie potlačené novým prostredím	Slabá
Y-bludisko	Slabá
Elektrofyziológia in vivo	Bez možnosti zotavenia
12-zvodové EKG	Bez možnosti zotavenia
Meranie krvného tlaku	Slabá
Humánne utratenie a odber vzoriek	Bez možnosti zotavenia

Kedže v rámci projektu uvažujeme s metodikami, ktoré spadajú pod strednú mieru krutosti, zvieratá budú po podstúpení takéhoto zákroku monitorované. Zvieratám bude zabezpečený čas na dostatočnú regeneráciu po jednotlivých testoch a o humane end point bude rozhodnuté na základe nasledujúceho skóre:

Human end point skóre

VZHĽAD	PREJAV	SKÓRE
vzhľad príjem potravy a vody	Normálny	0
	Absencia čistenia srsti	1
	Piloerekcia, chúlenie sa	2
príjem potravy a vody prirodzené správanie	Normálny	0
	Prijíma: telesná hmotnosť znížená o 10-15%	1
	Neprijíma potravu, ani vodu	2
prirodzené správanie provokované správanie	Normálne	0
	Menej pohyblivé a pozorné, izolované	1
	Vokalizácia, sebamrzačenie, nepokojné, alebo nehybné	2
provokované správanie	Normálne	0
	Zmeny v očakávanom správaní	1
	Reaguje prudko, alebo veľmi slabo a prekomatózne	2
SPOLU		0-8

Hodnotenie skóre:

0-2

norma

3-5

vyžiadanie názoru

veterinárneho lekára

6 a viac

eutanázia

PREDPOKLADANÁ ÚROVEŇ KRUTOSTI: STREDNÁ.

SÚLAD S POŽIADAVKAMI „3R“

Zásada nahradenia

Postup nie je možné vykonať nahradením animálneho experimentálneho modelu alternatívnym modelom. Alternatívne metódy nedokážu zachytiť komplexnosť skúmanej metodiky. Testovaním *in vitro* alebo *in silico* nie je možné sledovať komplexné interakcie prebiehajúce v organizme, napríklad odpoveď nervového, endokrinného a imunitného systému. Pričom na vyhodnotenie celkovej bezpečnosti podávania antidepresív počas gravidity je nutné sledovať odpoveď všetkých spomínaných systémov ako u ovplyvnených matiek tak u potomkov.

Zásada obmedzenia

Počet zvierat v projekte zodpovedá najmenšiemu možnému počtu, na základe ktorých môžu byť získané výsledky štatisticky vyhodnotené, t.j. jedná sa o minimálny počet experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť, validita a štatistické vyhodnotenie. S ohľadom na kvalitu života zvierat a časovú náročnosť experimentov a ich analýzy je v našom najlepšom záujme vykonať čo najmenej postupov na získanie interpretovateľných výsledkov a použiť čo najmenej zvierat na získanie validovaných dôležitých poznatkov nevyhnutných pre pochopenie mechanizmov účinku sledovaných látok.

Zásada zjemnenia

So zvieratami sa bude šetrne zaobchádzať po celú dobu projektu a budú pod každodenným dohľadom skúsených pracovníkov. Zvieratám bude zabezpečený čas na dostatočnú regeneráciu po jednotlivých testoch (3-4 dni). Zvieratá budú monitorované počas celej dĺžky experimentu na základne humane end point skóre bude rozhodnuté a pokračovanie alebo zastavenie experimentu.

SPÄTNÉ POSÚDENIE : nie

SVPS sa rozhodla, že ANO: správne posúdenie
do 31.05.2023

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 4295/18-221/3

Vytvorenie trojitého *in vitro* bunkového modelu pre štúdium transportu látok

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): *in vitro* model, hematoencefalická bariéra, tauopátie

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 kolónii geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Podrobný účel postupu:

Hematoencefalická bariéra (HEB) je bariéra zodpovedná za kontrolu transportu látok medzi periférnym prostredím organizmu a centrálnou nervovou sústavou. HEB predstavuje prekážku pre transport látok s veľkou molekulovou hmotnosťou ako sú peptidy, rekombinantné proteíny, monoklonálne protilátky, liečivá na báze RNA, či liečivá génovej terapie. Tento fakt limituje možnosti farmakoterapie mozgu a vedie k intenzívnemu výskumu v danej oblasti.

Aby bolo možné v podmienkach *in vitro* študovať mechanizmus transportu látok, proteínov, či krátkych peptidov medzi krvou resp. cerebrospinálnou tekutinou a centrálnou nervovou sústavou a zároveň nájsť účinný systém použiteľný pre transport terapeutík do mozgu, je potrebné vytvoriť vhodný bunkový model.

Z anatomického hľadiska je HEB tvorená tzv. neuro-vaskulárnou jednotkou, ktorá pozostáva z nervových, gliových a endotelových buniek. Nami vytvorený trojitý HEB bunkový model pre sledovanie transportu látok medzi krvou a mozgom bude pozostávať z primárnych gliových buniek, pericytov a endotelových buniek. Pre sledovanie transportu látok medzi cerebrospinálnou tekutinou a mozgom bude použitý bunkový model zhotovený z primárnych epitelových buniek.

Zvieratá v predkladanom projekte budú použité na prípravu primárnych bunkových kultúr, ktoré následne budú slúžiť na zhotovenie bunkových modelov. Vytvorený bunkový model bude použitý pre štúdium testovania prechodu látok do mozgu a stanovenia základných farmakokinetických parametrov testovaných látok. Na základe uvedených parametrov bude možné vyselektovať látky, ktoré môžu byť v budúcnosti použité ako terapeutické systémy pre transport liečiv do mozgu.

Zvieratá budú uvedené do hlbkej anestézie, perfundované pomocou PBS a humanne usmrtené pomocou dekapitácie a následne im bude odobraté mozgové tkanivo. Mozgové tkanivá budú použité na prípravu primárnych gliových, endotelových, epitelových a pericytových bunkových kultúr.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Za účelom štúdia transportu látok, proteínov a krátkych peptidov medzi krvou resp. cerebrospinálnou tekutinou a centrálnou nervovou sústavou je nevyhnutné vytvorenie funkčného *in vitro* bunkového modelu. Bunkový model bude pozostávať z gliových buniek, pericytov a endotelových buniek. Pre sledovanie transportu látok medzi cerebrospinálnou tekutinou a mozgom bude použitý model zhotovený z primárnych epitelových buniek.

Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

V pravidelných týždňových intervaloch bude použitých 8 1- až 2-dňových zvierat a 4 dospelé samice kmeňa Sprague Dawley.. Počet zvierat zohľadňuje potrebu pravidelnej prípravy viacerých bunkových kultúr.

Celkovo bude použitých:

800 SD potkanov- z toho predpokladáme použitie približne 280 dospelých samíc a 520 mlád'at

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

Dospelé samice – budú uvedené do hlbkej anestézie, perfundované pomocou PBS a humanne usmrtené pomocou dekapitácie a následne im bude odobraté mozgové tkanivo – bez možnosti zotavenia

Mlád'atá - Ihneď po odbere od matky 1-dňové mlád'atá budú usmrtené dekapitáciou pomocou nožníc- stredná

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Trvanie 1-2 minúty.	Slabá
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd. Následne sa vykoná perfúzia s roztokom PBS alebo sa zviera humanne usmrť dekapitáciou.	Bez možnosti zotavenia
Dekapitácia (1dňové mlád'atá)	Ihneď po odbere od matky 1-dňové mlád'atá budú usmrtené dekapitáciou pomocou nožníc.	Stredná
Celkové hodnotenie krutosti štúdie		Bez možnosti zotavenia a stredná

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné štandardné pracovné postupy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humanne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociálnym potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. V zverinci NIÚ SAV je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humannému usmrteniu zvieraťa.

Redukcia: V navrhovanom experimente budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, je potrebné vytvorenie funkčného trojitého bunkového modelu, ktorý bude pozostávať z primárnych bunkových kultúr a bude schopný vytvoriť čo najpresnejší obraz situácie odohrávajúcej sa v mozgu.

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokéj anestézii. Zvieratá budú humanne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pri vývoji nových terapeutických systémov pre transport liečiv do mozgu.

Začiatok pokusu je plánovaný na 10.2. 2019 a bude sa realizovať do 10.2. 2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

PRÍLOHA č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

4296/19-221/3

Názov projektu:

„Štúdia hodnotenia biologickej aktivity vzorky lieku Imunor (Transfer faktor)“

Podrobný opis účelu projektu a východisková situácia projektu:

Účelom projektu je otestovanie biologickej aktivity každej novo vyrobenej šarže prípravku Imunor, ktorý sa používa na prevenciu a liečbu porúch imunity. Inbredné myši kmeňov Balb/c alebo C3H sú nevyhnutným schváleným a overeným zdrojom imunitných buniek. Na súčasnom stupni vedeckého poznania neexistuje alternatívny validovaný *in vitro* testovací systém na bunkových líniiach, ktorý by nahradil používaný model. Meranie *in vitro* proliferácie aktivity slezinových lymfocytov myši po ovplyvnení Imunorom je šetrný spôsob zisťovania biologickej aktivity lieku a výrazne redukuje utrpenie zvierat aj manipuláciu s nimi.

Špecifické ciele projektu:

- **Kvalitatívny** - Testovaním novo vyrobených šarží lieku Imunor prispieť k dobrej účinnosti a vysokej kvalite vyrobeného lieku.
- **Terapeutický** – liek pre ľudí so zníženou imunitou. Liek Imunor je indikovaný najmä pre liečbu v prípadoch laboratórne dokázanej poruchy bunkovej imunity (zníženie celkového počtu T-lymfocytov, zníženie CD4+ T-pomocných lymfocytov, zvýšenie CD8+ T-supresorových lymfocytov), ďalej v klinických prípadoch ochorení, o ktorých je známe, že sú zvyčajne spojené s poruchou bunkovej imunity. Ďalej je indikovaný pri deficitoch humorálnej imunity s laboratórne dokázaným znížením hladiny imunoglobulínov a kolísavými nálezmi porušenej bunkovej imunity s klinickým obrazom recidivujúcich infektov rôznych lokalít.
- **Ekonomický** – bez otestovania šarže nie je možné liek prepustiť do distribúcie.

Počet a typ zvierat, ktoré sa v projekte použijú:

Použijú sa mladé dospelé negravidné samice inbredného kmeňa myši Balb/c alebo C3H. Na začiatku štúdie budú zvieratá vo veku 8-10 týždňov a hmotnosti 18-24 g.

Počet zvierat v pokuse na celé požadované obdobie (rok 2019 – 2023):

Počet novo vyrobených šarží lieku Imunor	50 šarží
Počet zvierat na otestovanie 1 šarže – 6 zvierat, 3 opakovania	18 ks
Počet zvierat celkom na otestovanie 50 vzoriek Imunoru	50x18 = 900 ks

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Požiadavka nahradenia:

Slezina pokusných zvierat bude slúžiť ako zdroj na izoláciu slezinových lymfocytov, ktoré sa použijú pri realizácii testu Proliferačnej aktivity lymfocytov. Neexistuje relevantná náhrada pre izoláciu potrebných buniek (**Požiadavka nahradenia**).

Počet zvierat v jednom pokuse je uvedený v štandardných pracovných postupoch. Realizácia prebieha v 3 nezávislých opakovaní, pričom v každom opakovaní sa použije 6 ks zvierat. Celkovo použijeme 18 ks zvierat, čo je minimálne množstvo na to, aby sa neznížila reprodukovateľnosť a validita pokusu (**Požiadavka obmedzenia**).

V prípade, že zadávateľ požiadava súčasne o otestovanie 2 nových šarží lieku Imunor, na pokus sa použijú tie isté zvieratá, čiže ich množstvo sa nenavýši (**Požiadavka obmedzenia**).

Zvieratá budú pred pokusom ustajnené v kletke spolu a bude im zabezpečená štandardná starostlivosť (**Požiadavka zjemnenia**).

Zvieratá budú usmrtené dekapitáciou pri slabej Izofluranovej anestézii. Dekapitáciu použijeme z dôvodu nutnosti odkrvenia zvierat'a. Nie je možné použiť iný spôsob odkrvenia myší. (**Požiadavka zjemnenia**).

Opis vzniknutej ujmy na zvieratách (doplnenie netechnického zhrnutia projektu)

Počas realizácie projektu budú na zvieratách vykonávané postupy zaradené podľa klasifikácie krutosti postupov v súlade s Prílohou č. 4 k Nariadeniu vlády č. 377/2012 Z. z. nasledovne: Dekapitácia zvierat v inhalačnej anestézii Izofluranom: slabé postupy

Príloha č. 5

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Pľúcny surfaktant ako súčasť obranných mechanizmov respiračného systému: využitie troch modelov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4298/18-221/3

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): pľúcny surfaktant, endotoxín, poškodenie pľúc, reaktivita, hladký sval

Účel projektu: Základný výskum

Informácie o cieľoch projektu:

Projekt je členený na niekoľko častí, ktorých spoločným CIEĽOM je hlbšia analýza stavov spojených s inaktiváciou pľúcneho surfaktantu pri vniknutí endotoxínu do organizmu cez respiračný systém alebo krvnou cestou a možnosť zmiernenia respiračného zlyhávania aplikáciou exogénneho surfaktantu v kombinácii s inou farmakoterapiou. Ďalším cieľom je zistiť vplyv endotoxínu na jednotlivé štruktúry respiračného systému (alveolárny epitel, endotel pľúcnych kapilár a hladký sval dýchacích ciest) a zistiť, akú úlohu v interakcii jednotlivých štruktúr s endotoxínom zohráva pľúcny surfaktant.

- overiť hypotézu, že priaznivý efekt pľúcneho surfaktantu je možné potencovať pridaním látky, ktorá inhibuje jednotlivé prozápalové a prooxidačné signálne kaskády (n-acetyl cysteín; NAC) alebo antimikrobiálnymi peptidmi (cathelicidinom LL 37), ktoré pravdepodobne priamo interferujú s endotoxínom. Predpokladáme, že kombinovaná terapia bude mať výraznejší účinok na zlepšenie pľúcnych funkcií a na zápalové a oxidačné procesy sprevádzajúce poškodenie pľúc po endotoxíne v porovnaní s monoterapiou surfaktantom, pričom budeme sledovať funkčnú odozvu i molekulárnu podstatu účinku liečby. Očakávaným výsledkom je, že liečba exogénnym surfaktantom sa ukáže, ako priaznivá pri liečení respiračného zlyhávania vyvolaného LPS a že surfaktant bude môcť byť v budúcnosti použitý ako nosič na transport antibiotík do respiračného systému.

- modelovať akútne poškodenie pľúc intravaskulárnym podaním endotoxínu a overiť hypotézu, že poškodenie endotelových buniek pľúcnych kapilár endotoxínom možno pozitívne ovplyvniť látkami s protizápalovým a protioxidačným pôsobením po ich i.v. podaní.

- modelovať v klinike častú situáciu, kedy je potrebné ventilovať pacienta vysokými inspiračnými frakciami kyslíka. V tejto časti projektu na tzv. „double-hit“ modeli t.j. modeli dvojitého poškodenia pľúc a surfaktantu (endotoxínom a vysokou FiO₂) otestujeme vhodnú veľkosť dávky NAC pri intravenóznom spôsobe podania.

- ďalším cieľom v tejto časti je zistiť, ako pôsobí endotoxín na hladký sval dýchacích ciest – či vedie k hypo- alebo hyperreaktivite. Hoci literárne údaje sa v tomto ohľade rozchádzajú, predpokladáme skôr, že LPS vyvoláva hyperreaktivitu. O surfaktante je známe, že má relaxačný vplyv na hladký sval dýchacích ciest a preto overíme hypotézu, že eventuálny hyperreaktivita bude zablokovávaná surfaktantom. Budú nás zaujímať aj

mechanizmy, ktorými surfaktant hladký sval relaxuje. Cieľ tretej etapy overíme in vitro na prúžku hladkého svalu trachey morčiat – zdravých, po inkubácii svalu s endotoxínom, ako aj u zvierat, ktoré bude endotoxín aplikovaný niekoľkodňovým intraperitoneálnym podaním. V projekte plánujeme použiť model hyperreaktivity dýchacích ciest podobný bronchiálnej astme, ktorý navodíme senzibilizáciou ovalbumínom u morčiat.

Predpokladaný vlastný prínos projektu:

Projekt prinesie ďalšie originálne poznatky týkajúce sa jednej z kľúčových úloh surfaktantu v obranných mechanizmoch pľúc v situáciách bakteriálneho zápalu, imitovaného podaním lipopolysacharidu (LPS). V už vytvorenom modeli akútneho poškodenia pľúc u dospelých jedincov intratracheálnym podaním LPS sa otestuje vhodnosť kombinovanej terapie surfaktantu s protizápalovými látkami (N-acetyl cysteín) a antimikrobiálnou látkou LL-37. Predpokladá sa pozitívum takejto liečby, avšak treba ho dokázať. Túto terapiu otestujeme aj na novozavedenom modeli imitujúcom vstup LPS do organizmu krvnou cestou. dôkaz priaznivého efektu tejto liečby bude dôležitým poznatkom, potenciálne využiteľným v klinickej praxi. Touto tematikou sme sa zaoberali už v minulosti, a pozitívne výsledky nás inšpirovali pre pokračovanie a komplexné skúmanie vzťahu surfaktant/lipopolysacharid, nakoľko v projekte sa budú využívať aj iné metodiky (tkanivové kultúry, surfaktometer, malouhlová a širokouhlová RTG difrakcia). Možnosť zablokovať nežiaduci vplyv LPS na hladký sval dýchacích ciest sa potvrdí v modeli na prúžkoch hladkého svalu morčiat. Pre klinickú prax bude významný dôkaz, že surfaktant možno pomerne jednoducho obohatiť antioxidantmi a proteizápalovými látkami bez toho, aby tieto látky negatívne ovplyvnili jeho štruktúru a fyziologické vlastnosti. A teda že surfaktant môže poslúžiť ako nosič antibiotík pre ich vpravenie do respiračného systému pri diagnózach akútneho pľúcneho poškodenia vyvolaného lipopolysacharidom. Takáto liečba eliminuje nežiaduce systémové účinky ďalších liečiv a zvyšuje ich dostupnosť v mieste pôsobenia, teda v bronchoalveolárnom priestore.

Počet a druh zvierat:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*, kmeň WISTAR), samce, 172 jedincov
Morča domáce (*Cavia aperea f. porcellus*, kmeň TRIK), samce, 90 jedincov

Predpokladaná ujma na zvieratách:

Manipulácia so zvieratami bude zabezpečená tak, aby boli uspokojené ich základné fyziologické potreby vrátane klimatických podmienok a poskytnutia optimálneho množstva vhodnej potravy a tekutín *ad libitum*. Do laboratória budú zvieratá dodané z centrálneho zverinca výťahom určeným na transport zvierat a budú umiestnené v laboratóriu, kde im zabezpečíme vhodné podmienky.

Potkany: Po aklimatizácii na podmienky prostredia šetrným spôsobom a bez vyvolávania zbytočného stresu zvieratám podáme anestéziu (uretán a chloralóza i.p.). V celkovej anestézii budú následne vykonávané všetky chirurgické zákroky – naoperovanie a zavedenie tracheálnej kanyly a katétrov do a. a v. femoralis a v. jugularis ext. V celom ďalšom priebehu postupu budú zvieratá v celkovej anestézii, hĺbka ktorej bude udržiavaná kontinuálnym podávaním anestetika (uretán a chloralóza) i.v. pumpou a bude priebežne monitorovaná a kontrolovaná. V prípade potreby bude dávka anestetika

zvýšená. Počas postupu budú zvieratá umiestnené na vyhrievanom operačnom stole, aby nedošlo k neprimeranému poklesu ich telesnej teploty. Priebežne budú zvieratám kontrolované vitálne funkcie (tlak krvi, frekvencia srdca). Po skončení postupu zviera v anestéze usmrtime humánnym spôsobom, ktorý vylúči fyzické a duševné utrpenie zvierat a to exsanguináciou.

Morčatá: Model „bronchiálnej astmy“ navodíme opakovanou senzibilizáciou morčiat ovalbumínom. Kontrolným nesesenzibilizovaným skupinám v uvedených časových intervaloch podáme sterilný fyziologický roztok zodpovedajúcich objemov. Po vytvorení modelu intraperitoneálne podáme liečbu, a to denne 15.-21. deň, na 21. deň opakovaná expozícia OVA a následné usmrtenie zvierat podaním letálnej dávky anestetika i.p. Senzibilizácia ovalbumínom, podanie liečby ako aj ukončenie postupu letálnou dávkou anestetika sa bude realizovať priamo v časti zverinca vyhradenej na takéto zákroky. Zvieratá neopustia známe priestory, čím budeme minimalizovať stres zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Potkany: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „slabú“/„bez možnosti zotavenia“, nakoľko zviera v bdelom stave je podrobené len jednému rýchlemu intraperitoneálnemu vpichu tenkej injekčnej ihly pri podaní anestetika, ostatné výkony vrátane eutanázie sú realizované v celkovej anestéze zvierat.

Morčatá: Model „bronchiálnej astmy“: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „strednú“, nakoľko pri vyvolávaní modelu „bronchiálnej astmy“ sú zvieratá v bdelom stave podrobené opakovanému intraperitoneálnemu alebo subkutánnemu vpichu resp. inhalačnému podaniu ovalbumínu, ako aj intraperitoneálnemu podávaniu liečiv. Zároveň je potrebné zohľadniť zhoršený stav prežívajúcich zvierat s modelom „bronchiálnej astmy“. Vzhľadom na druh ujmy (vyvolanie respiračného ochorenia) je možné predpokladať, že zvieratá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zježenie srsti a pod. V prípade zhoršenia zdravotného stavu morčiat s modelom bronchiálnej astmy (opakovaná senzibilizácia ovalbumínom), ktoré presahuje mieru očakávaného zhoršenia stavu v súvislosti s vyvolávaným ochorením, vedúci projektu na základe výsledného human endpoint skóre a po konzultácii s veterinárnym lekárom rozhodne o humánnom ukončení postupu eutanáziou.

Klasifikácia krutosti postupov: potkany - slabá/bez možnosti zotavenia
morčatá - stredná/bez možnosti zotavenia

Klasifikácia krutosti postupov projektu celkovo: „stredná“.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Potkan laboratórny je v súčasnosti akceptovaný ako relevantný model poškodenia pľúc vyvolaného LPS a morča domáce pre vytvorenie modelu bronchiálnej astmy a štúdium na hladkom svale dýchacích ciest je optimálnym riešením pre dosiahnutie cieľov. Pri takto plánovanom projekte nie je možné použiť nižší živočíšny druh. Vzhľadom na protokol postupov projektu sú potkany a morčatá najvhodnejšími živočíšnymi druhmi v našich podmienkach.

Obmedzenie (Reduction): Na získanie platných výsledkov použijeme 8 zvierat/potkanov v každej ventilovanej resp. liečenej skupine a 7 zvierat/potkanov v kontrolnej skupine, čo považujeme za najnižší možný počet. V experimentoch na morčatách použijeme 12 ks zvierat/morčiat v skupine s i.p. podaním LPS a *in vitro* aplikovaným surfaktantom. Očakávame väčšiu inter-individuálnu variabilitu, nakoľko stupeň zápalovej reakcie môže variovať. V skupinách s podaním len fyziologického roztoku, resp. bez i.p. podania sa takéto rozdiely neočakávajú. Preto predpokladáme, že pre získanie potrebného počtu vzoriek postačia menšie počty zvierat/morčiat (n=8). Takéto počty zvierat považujeme za optimálne tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj získania objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat už nie je možné použiť pre výraznejšie inter-individuálne rozdiely a príp. spochybnenie objektívnosti výsledkov. Navrhované postupy sú zároveň usporiadané tak, aby sa z každého zvieraťa získalo maximálne množstvo vzoriek a údajov pre analýzy. Zvyšok vzoriek bude odložený v hlboko-mraziacich boxoch, aby sa mohli využiť aj pri prípadných dodatočných analýzach bez potreby použitia ďalších zvierat.

Zjemnenie (Refinement):

Operačné výkony budú vykonávané v celkovej anestéze, pričom bezvedomie zvieraťa je počas celého postupu zabezpečené kontinuálnym podávaním anestetika a stupeň bezvedomia je priebežne kontrolovaný. Po skončení postupu zviera usmrtime humánnym spôsobom a to exsanguináciou. Všetky výkony vrátane podávania liečby a eutanázie sú realizované v celkovej anestéze zvieraťa.

Model „bronchiálnej astmy“ navodíme senzibilizáciou morčiat ovalbumínom (OVA) počas 14 dní; 1. deň: OVA i.p. (0,5 ml) + OVA s.c. (0,5 ml), 3. deň: OVA i.p. (1,0 ml), inhalačná senzibilizácia 1% OVA 14. deň. Kontrolnej nesenzibilizovanej skupine v uvedených časových intervaloch podáme sterilný fyziologický roztok zodpovedajúcich objemov. Senzibilizácia ovalbumínom sa bude realizovať priamo v priestoroch Centrálného zverinca JLF UK v laboratóriu vyhradenom na takéto zákroky, zvieratá neopustia známe priestory CZ, čím budeme minimalizovať stres zvierat. Pri vyvolávaní modelu „bronchiálnej astmy“ sú zvieratá v bdelom stave podrobené opakovanému intraperitoneálnemu alebo subkutánnemu vpichu ovalbumínu resp. inhalačnému podaniu OVA. Zároveň je v súvislosti s vyvolávaním modelu „bronchiálnej astmy“ potrebné zohľadniť aj možné zhoršenie zdravotného stavu prežívajúcich zvierat. Vzhľadom na druh ujmy (vyvolanie respiračného ochorenia) je možné predpokladať, že zvieratá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zježenie srsti a pod. Z tohto dôvodu hodnotíme krutosť postupov v tejto etape projektu ako „strednú“. Stav zvierat určených pre chronické postupy (model „bronchiálnej astmy“) bude pravidelne monitorovaný vedúcim projektu alebo inou poverenou, odborne spôsobilou osobou. Za účelom obmedzenia, zabránenia a zmiernenia akejkoľvek formy utrpenia zvieraťa použijeme stupnicu hodnotenia welfare zvieraťa. V prípade zhoršenia zdravotného stavu zvieraťa sa bude postupovať podľa hodnoty celkového human end-point skóre.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha č. 5

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Pľúcny surfaktant ako modulátor odpovede organizmu na expozíciu endotoxínu: efekty a mechanizmy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4298/18-221/3a

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): pľúcny surfaktant, lipopolysacharid, poškodenie pľúc, hladký sval, reaktivita

Účel projektu: Základný výskum

Informácie o cieľoch projektu:

Projekt je členený na niekoľko častí, ktorých spoločným CIEĽOM je hlbšia analýza stavov spojených s inaktiváciou pľúcneho surfaktantu pri vniknutí endotoxínu do organizmu cez respiračný systém alebo krvnou cestou a možnosť zmiernenia respiračného zlyhávania aplikáciou exogénneho surfaktantu v kombinácii s inou farmakoterapiou. Ďalším cieľom je zistiť vplyv endotoxínu na jednotlivé štruktúry respiračného systému (alveolárny epitel, endotel pľúcnych kapilár a hladký sval dýchacích ciest) a zistiť, akú úlohu v interakcii jednotlivých štruktúr s endotoxínom zohráva pľúcny surfaktant.

- overiť hypotézu, že priaznivý efekt pľúcneho surfaktantu je možné potencovať pridaním látky, ktorá inhibuje jednotlivé prozápalové a prooxidačné signálne kaskády (n-acetyl cystein; NAC) alebo antimikrobiálnymi peptidmi (cathelicidinom LL 37), ktoré pravdepodobne priamo interferujú s endotoxínom. Predpokladáme, že kombinovaná terapia bude mať výraznejší účinok na zlepšenie pľúcnych funkcií a na zápalové a oxidačné procesy sprevádzajúce poškodenie pľúc po endotoxíne v porovnaní s monoterapiou surfaktantom, pričom budeme sledovať funkčnú odozvu i molekulárnu podstatu účinku liečby. Očakávaným výsledkom je, že liečba exogénnym surfaktantom sa ukáže, ako priaznivá pri liečení respiračného zlyhávania vyvolaného LPS a že surfaktant bude môcť byť v budúcnosti použitý ako nosič na transport antibiotík do respiračného systému.

- modelovať akútne poškodenie pľúc intravaskulárnym podaním endotoxínu a testovať vplyv jednotlivých druhov liečby, pričom otestujeme hypotézu, že intratracheálne podanie NAC dokáže intenzívnejšie potencovať vplyv exogénneho surfaktantu a zároveň ho „ochrániť“ pred inaktiváciou. Na druhej strane, priaznivý efekt možno predpokladať aj pri i.v. podaní NAC. Preto ďalším čiastkovým cieľom tejto časti bude dokázať hypotézu, že poškodenie endotelových buniek pľúcnych mikropilár endotoxínom možno priaznivo ovplyvniť látkami s protizápalovým a protioxidačným pôsobením po ich intravaskulárnom podaní.

- modelovať v klinike častú situáciu, kedy je potrebné ventilovať pacienta vysokými inspiračnými frakciami kyslíka. V tejto časti projektu na tzv. „double-hit“ modeli t.j. modeli dvojitého poškodenia pľúc a surfaktantu (endotoxínom a vysokou FiO₂) otestujeme vhodnú veľkosť dávky NAC pri oboch spôsoboch podania – intratracheálne a intravenózne.

- ďalším cieľom v tejto časti je zistiť, ako pôsobí endotoxín na hladký sval dýchacích ciest – či vedie k hypo- alebo hyperreaktivite. Hoci literárne údaje sa v tomto ohľade rozchádzajú, predpokladáme skôr, že LPS vyvoláva hyperreaktivitu. O surfaktante je známe, že má relaxačný vplyv na hladký sval dýchacích ciest a preto overíme hypotézu, že eventuálny hyperreaktivita bude zablokovaná surfaktantom. Budú nás zaujímať aj mechanizmy, ktorými surfaktant hladký sval relaxuje. Cieľ tretej etapy overíme in vitro na prúžku hladkého svalu trachey morčiat – zdravých, po inkubácii svalu s endotoxínom, ako aj u zvierat, ktorým budú endotoxín aplikovaný niekoľkodňovým intraperitoneálnym podaním.

Predpokladaný vlastný prínos projektu:

Projekt prinesie ďalšie originálne poznatky týkajúce sa jednej z kľúčových úloh surfaktantu v obranných mechanizmoch pľúc v situáciách bakteriálneho zápalu, imitovaného podaním lipopolysacharidu (LPS). V už vytvorenom modeli akútneho poškodenia pľúc u dospelých jedincov intratracheálnym podaním LPS sa otestuje vhodnosť kombinovanej terapie surfaktantu s protizápalovými látkami (N-acetyl cysteín) a antimikrobiálnou látkou LL-37. Predpokladá sa pozitívum takejto liečby, avšak treba ho dokázať. Túto terapiu otestujeme aj na novozavedenom modeli imitujúcom vstup LPS do organizmu krvnou cestou. Dôkaz priaznivého efektu tejto liečby bude dôležitým poznatkom, potenciálne využiteľným v klinickej praxi. Touto tematikou sme sa zaoberali už v minulosti, a pozitívne výsledky nás inšpirovali pre pokračovanie a komplexné skúmanie vzťahu surfaktant/lipopolysacharid, nakoľko v projekte sa budú využívať aj iné metodiky (tkanivové kultúry, surfaktometer, malouhlová a širokouhlová RTG difrakcia). Možnosť zablokovať nežiaduci vplyv LPS na hladký sval dýchacích ciest sa potvrdí v modeli na prúžkoch hl.svalu morčiat. Pre klinickú prax bude významný dôkaz, že surfaktant možno pomerne jednoducho obohatiť antioxidantmi a protizápalovými látkami bez toho, aby tieto látky negatívne ovplyvnili jeho štruktúru a fyziologické vlastnosti. A teda že surfaktant môže poslúžiť ako nosič antibiotík pre ich vpravenie do respiračného systému pri diagnózach akútneho pľúcneho poškodenia vyvolaného lipopolysacharidom. Takáto liečba eliminuje nežiaduce systémové účinky ďalších liečiv a zvyšuje ich dostupnosť v mieste pôsobenia, teda v bronchoalveolárnom priestore.

Počet a druh zvierat:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*, kmeň WISTAR), samce, 124 jedincov

Morča domáce (*Cavia aperea f. porcellus*, kmeň TRIK), samce, 90 jedincov

Predpokladaná ujma na zvieratách:

Manipulácia so zvieratami bude zabezpečená tak, aby boli uspokojené ich základné fyziologické potreby vrátane klimatických podmienok a poskytnutia optimálneho množstva vhodnej potravy a tekutín *ad libitum*. Do laboratória budú zvieratá dodané z centrálneho zverinca výťahom určeným na transport zvierat a budú umiestnené v laboratóriu, kde im zabezpečíme vhodné podmienky (pokoj, primeraná teplota 20-24 °C, vlhkosť vzduchu 40-60 %).

Potkany: Po aklimatizácii na podmienky prostredia šetrným spôsobom a bez vyvolávania zbytočného stresu zvieratám podáme anestéziu (uretán a α -chloralóza i.p.). V celkovej anestézii budú následne vykonávané všetky chirurgické zákroky – naoperovanie a

zavedenie tracheálnej kanyly a katétrov do a. a v. femoralis a v. jugularis ext. V celom ďalšom priebehu postupu budú zvieratá v celkovej anestézii, hĺbka ktorej bude udržiavaná kontinuálnym podávaním anestetika (uretán a α -chloralóza) i.v. pumpou a bude priebežne monitorovaná a kontrolovaná. V prípade potreby bude dávka anestetika zvýšená. Počas postupu budú zvieratá umiestnené na vyhrievanom operačnom stole, aby nedošlo k neprimeranému poklesu ich telesnej teploty. Priebežne budú zvieratám kontrolované vitálne funkcie (tlak krvi, frekvencia srdca). Po ukončení postupu sa humánnym spôsobom-exsangvináciou vykoná usmrtenie zvierat'a.

Morčatá: Z hľadiska posúdenia možného prínosu projektu je predpokladaná ujma na zvieratách primeraná, keďže celý postup je vykonávaný v celkovej anestézii zvierat'a. Pred postupom bude zvieratám i.p. jedenkrát denne aplikovaná látka počas 4 dní a potom tieto zvieratá ako aj kontrolné zvieratá budú usmrtené humánnym spôsobom predávkovaním anestetikom v kombinácii Zoletilu v dávke 1,25 mg/ml a Xylariemu 2,0mg/ ml. Zvieratá neopustia známe priestory, čím budeme minimalizovať stres zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Potkany: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „slabú“/“bez možnosti zotavenia“, nakoľko zviera v bdelom stave je podrobené len jednému rýchlemu intraperitoneálnemu vpichu tenkej injekčnej ihly pri podaní anestetika, ostatné výkony vrátane eutanázie sú realizované v celkovej anestéze zvierat'a.

Morčatá: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „strednú“, nakoľko niektorým skupinám zvierat/morčatám bude aplikované počas 4 dní intraperitoneálne pri vedomí LPS 1mg/kg raz denne. Po privezení z centrálného zverinca, pred začiatkom postupu, budú zvieratá aklimatizované na podmienky laboratória (min. 30 min pred začiatkom pokusu). Podá sa im anestetikum Zoletil (1,25 mg/kg) a Xylariem (2,0 mg/kg), v dôsledku čoho v priebehu niekoľkých minút stratia vedomie. Následne bude vykonaná punkcia srdca a exsangvinácia vedúce k smrti.

Klasifikácia krutosti postupov:

slabá/bez možnosti zotavenia – potkany
stredná/bez možnosti zotavenia – morčatá

Klasifikácia krutosti postupov projektu celkovo: „stredná“.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Potkan laboratórny je v súčasnosti akceptovaný ako relevantný model poškodenia pľúc vyvolaného LPS. Pri takto plánovanom projekte nie je možné použiť nižší živočíšny druh. Vzhľadom na protokol postupov projektu je potkan najvhodnejším živočíšnym druhom v našich podmienkach. Morča sa vďaka svojmu imunologickému a receptorovému profilu blíži vlastnostiam človeka, preto je v z tohto pohľadu najvhodnejším živočíšnym druhom pre zvolený typ experimentov. Metóda umožní pripraviť viac preparátov z trachey, čím bude možné použiť menej zvierat. Charakter nášho projektu nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný 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.

Obmedzenie (Reduction): Na získanie platných výsledkov použijeme 8 zvierat/potkanov v každej ventilovanej resp. liečenej skupine a 7 zvierat/potkanov v kontrolnej skupine, čo považujeme za najnižší možný počet. V experimentoch na morčatách použijeme 10 ks zvierat/morčiat v skupine s i.p. podaním LPS a *in vitro* aplikovaným surfaktantom. Očakávame väčšiu inter-individuálnu variabilitu, nakoľko stupeň zápalovej reakcie môže variovať. V skupinách s podaním len fyziologického roztoku, resp. bez i.p. podania sa takéto rozdiely neočakávajú. Preto predpokladáme, že pre získanie potrebného počtu vzoriek postačia menšie počty zvierat/morčiat ($n=6$). Takéto počty zvierat považujeme za optimálne tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj získania objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat už nie je možné použiť pre výraznejšie inter-individuálne rozdiely a príp. spochybnenie objektívnosti výsledkov. Navrhované postupy sú zároveň usporiadané tak, aby sa z každého zvieratá získalo maximálne množstvo vzoriek a údajov pre analýzy. Zvyšok vzoriek bude odložený v hlboko-mraziacich boxoch, aby sa mohli využiť aj pri prípadných dodatočných analýzach bez potreby použitia ďalších zvierat.

Zjemnenie (Refinement): Operačné výkony u potkanov budú vykonávané v celkovej anestézii (uretán 600 mg/kg + α -chloralóza 60 mg/kg i.p.). Počas ďalšieho priebehu postupu budú zvieratá v celkovej anestézii, ktorá bude udržiavaná kontinuálnym i.v. podaním α -chloralózy (4 mg/kg/hod) + uretánu (80 mg/kg/hod) injekčným dávkovačom. Po operácii bude zvieratám venovaná štandardná pooperačná starostlivosť.

Vzhľadom na druh ujmy u morčiat (4 dňové i.p. podanie LPS 1mg/kg hmot. raz denne) je možné predpokladať, že morčatá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zježenie srsti a pod. Zdravotný stav zvierat bude pravidelne monitorovaný vedúcim projektu alebo inou poverenou, odborne spôsobilou osobou. Pre účel hodnotenia welfare zvieratá použijeme stupnicu hodnotenia vzhľadu, príjmu potravy a vody, klinických príznakov, prirodzeného a provokovaného správania. V prípade zhoršenia zdravotného stavu zvieratá, ktoré presahuje mieru očakávaného zhoršenia stavu v súvislosti s vyvolávaným ochorením, počas realizácie postupu vedúci projektu na základe výsledného human end-point skóre a po konzultácii s veterinárnym lekárom rozhodne o humánnom ukončení postupu podaním letálnej dávky anestetika. Usmrtenie zvieratá bude realizované exsanguináciou po navodení celkovej anestézie i.p. podaním letálnej dávky anestetika v kombinácii Zoletil (1,25 mg/kg) a Xylariem (2,0 mg/kg).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Nové prístupy k liečbe kachexie, zápalu a oxidačného stresu v experimentálnej artritíde:
Účinok rôznych rastlinných extraktov z olivových listov, Rhodiola rosea,
Tribulus terrestris a extra panenského olivového oleja

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4300/18-221/3

Kľúčové slová v projekte :

artritída, kachexia, metotrexát, listy olivovníka, Rhodiola rosea, Tribulus terrestris

Účel projektu:

Reumatoidná kachexia vedie k svalovej slabosti a strate funkčnej kapacity a predpokladá sa, že urýchľuje morbiditu a mortalitu pri reumatoidnej artritíde (RA).

Adjuvantná artritída (AA) je model RA, ktorý zahŕňa kachexiu a tiež vedie k zmenám v zložení tela podobných tým, ktoré majú pacienti s RA.

Náš projekt bude skúmať vzťah medzi základnými artritickými ukazovateľmi, zápalom, oxidačným stresom, lipidovým profilom, hormónami hladu a sýtosti.

Na tento účel používame AA indukovanú u potkanov Lewis. Na zníženie kachexie, zápalu a oxidačného stresu sa použijú tri rôzne rastlinné extrakty z olivových listov, Rhodiola rosea, Tribulus terrestris a panenský olivový olej v monoterapii a v kombinácii s metotrexátom.

Tieto rastlinné extrakty a panenský olivový olej majú viaceré biologické účinky (protizápalové, antioxidantné, adaptogénne, anabolické atď.) a môžu byť prospešné ako doplnková liečba k štandardným antireumatikám pri znižovaní artritckej kachexie.

Ciele projektu a reálnosť ich dosiahnutia:

Vybrané rastlinné extrakty z olivových listov, Rhodiola rosea a Tribulus terrestris a extra panenský olivový olej majú mnohoraké biologické účinky, ku ktorým patria aj protizápalové, antioxidantné, adaptogénne a anabolické.

Ich schopnosť ovplyvniť zápalovú kachexiu je však stále málo preskúmaná.

V projekte budeme študovať ich efektivitu v znížení markerov zápalu, oxidačného stresu a kachexie v monoterapiách a vybrané najúčinnějšíe extrakty resp. olivový olej v kombinácii s metotrexátom.

Najúčinnejšia kombinácia by mohla byť používaná ako doplnková liečba k štandardnej anti-reumatickej terapii RA pacientov s kachexiou.

Prínos z vykonaného projektu:

Výsledky našich experimentov s extraktom z listov olivovníka a extra panenského olivového oleja môžu pomôcť a urýchliť výskumný projekt našich kolegov z výskumného inštitútu potravín v Turecku, ktorí vyvíjajú nový výživový doplnok.

Tento nový produkt, ktorý je kombináciou olivového oleja a extraktu z listov olivovníka by mal mať vyššiu zdraviu prospešnú aktivitu ako samotný olivový olej.

Na základe dosiahnutých výsledkov je možné zaviesť do klinickej praxe liečebné postupy v priebehu 2 rokov od zverejnenia. U rastlinných extraktov sa neočakávajú toxické prejavy a

nežiadúce účinky na živé organizmy. Sú dostupné a používané v potravinárstve ako výživové doplnky a štandardizovaný extrakt z *Rhodiola rosea* je schválená komisiou Rastlinných medicínskych produktov Európskej agentúry pre lieky (EMA). Jedná sa o prvé originálne výsledky.

Najúčinnejšie rastlinné extrakty (všetky už používané ako výživové doplnky) sa predpokladajú na využitie v doplnkovej liečbe pacientov s reumatoidnou artritídou liečených metotrexátom, príp. ďalšími antireumatikami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe sa použije **270 laboratórnych potkanov kmeňa Lewis**, samcov 5-6 týždňových o hmotnosti 120-150 g.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:
Minimálny stres zvieratá utrpia počas aplikácie látok perorálne sondou a pri podaní samotnej anestézy intramuskulárne. Zvieratá môžu pociťovať mierny diskomfort pri čiastočnej fixácii pri aplikácii testovaných látok sondou *per os* a pri podaní anestetika. Tieto zákroky nemajú na zvieratá žiadne nepriaznivé trvalé účinky.

Použité zvieratá budú na konci experimentu usmrtené v anestéze a biologický materiál – krv, tkanivá a orgány budú použité na stanovenie parametrov opisujúcich oxidačné a zápalové procesy.

Predpokladaná úroveň krutosti: Postupy používané v našich experimentoch sa podľa klasifikácie v prílohe č.4 nariadenia vlády č. 377/2012 Z. z. hodnotia ako stredná krutosť

Na indukciu adjuvantnej artritídy sa použijú mykobaktériá v nekompletnom Freundovom adjuvansu. Potkany budú v kratšej anestézii (použije sa nižšia dávka oproti celkovej anestézii - zoletil 25mg/kg + xylazín 16 mg/kg živej hmotnosti), zavádzanie dermálnej ihly do medzikožia si vyžaduje jemné a presné nasmerovanie, ktoré nie je možné dosiahnuť pri bdelom stave. Navyše sa obmedzí pociťovanie bolesti z aplikácie kompletného Freundovho adjuvansu.

Zvieratá utrpia ujmu od 14. do 21. dňa experimentu, kedy sa klinicky prvotne prejavia účinky vyvolávajúceho agensu (CFA). Dochádza k opuchom kĺbových štruktúr predných a zadných končatín. Zároveň sa znižuje telesná hmotnosť a pohyblivosť potkanov. V nasledujúcom období od 21. do 28. dňa štúdie zvieratá odpúchajú a akútny stav prechádza do chronického, kde sa deštruujú kĺbové štruktúry. Telesná hmotnosť sa mierne zvyšuje.

Na zmiernenie bolesti od 14. dňa štúdie použijeme u všetkých skupín s adjuvantnou artritídou analgetikum vo forme Tramal v dávke 5 mg/kg.

Zvieratá budú ustajnené v skupinách po 5 potkanov, nie je nutné ich individuálne ustajnenie, nakoľko ani pri vyvolanom ochorení zvieratá nie sú agresívne.

Uplatňovanie zásad 3R:

1.Nahradenie zvierat:

Na dosiahnutie vytýčených cieľov je nutný experiment „in vivo“, alternatívne metódy na riešenie tohto komplexného problému nie sú vhodné.

2. Redukcia počtu zvierat:

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat 10 v skupine tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu na sledovanie imunologických, oxidačných a zápalových procesov ako aj ich štatistické vyhodnotenie. V prípade úhynu potkanov je potrebné zabezpečiť minimálne 7 zvierat pre štatistické vyhodnotenie výsledkov. Zvieratá budú samčieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom.

3. Zjemnenie:

Po presune z chovného zariadenia budú potkany v aklimatizácii po dobu 7 dní v predpísaných klietkach za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Po aplikácii mykobaktéria sa ustajnia individuálne. Aplikácie mykobaktéria a látok budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie klietky sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov budú humánne usmrtené. Ošetrovatelia budú kontrolovať zvieratá 2-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii predávkovaním.

Používanie humánneho ukončenia postupu:

Zvieratá sa v postupe usmrťia predčasne, ak vykazujú príznaky ochorenia uvedené v human endpoints.

Pri sledovanom ukazovateli s ohodnotením 0,1 sa vyčíslí prejav, ktorý sa buď nevyskytuje (0), resp. vyskytuje (1). Body označené 0,1,2,3 sú ohodnotené nasledovne: 0 – bez zmien, 1 – veľmi mierne zmeny, 2 – mierne zmeny, 3 – závažné zmeny. Zo sumarizácie všetkých hodnôt sa vypočíta výsledné percento, ktoré pri prevýšení 50 % slúži ako podklad pre návrh veterinárnemu lekárovi na eutanáziu.

Tabuľka human endpoints

		Vypočítaný príklad
		potkan na usmrtenie
• Neaktívny, menej aktívny	3	2
• Ataxický	1	1
• Suchá srst' bez lesku	3	0
• Kalné oči	3	0
• Vycivená tvár	1	0
• Oči prižmúrené	3	2
• Výtok z očí / nosa	3	2

• Nečistiaci sa	1	1
• Škriabanie sa	1	0
• Abnormálne dýchanie (dychy / min)	3	2
• Typ dýchania (rýchle, plytké, namáhavé, normálne)	3	2
• Výkaly mäkké / tvrdé	3	2
• Nežerúci	1	0
• Nepijúci	1	1
• Zhrbené držanie tela	1	1
• Naplnené brucho stravou	1	1
• Neprirodzená chôdza na špičkách	1	1
• Agresívny	1	0
• Bez čulosti/strehu	3	0
• Podráždené oči / nos	3	0
• Zdráhavý sa pohybovať	1	0
• Dehydrovaný / iný odtieň farby pokožky	3	2
• Vokalizácia	1	1
• Telesná hmotnosť	3	2
• % zmeny hmotnosti od začiatku	1	1
• % zmeny hmotnosti z predchádzajúceho dňa	1	1
• Teplota tela	3	2
Spolu:	53	27
V percentách:	100	50,94339623
		t.j. nad 50%

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie