

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu

4302/18-221/3

Názov projektu:

Neurobiologický výskum nádorových chorôb: skúmanie obojsmerných interakcií medzi nervovým systémom a nádorom

Kľúčové slová:

mamárny karcinóm, melanóm, neurobiológia nádorov

Účel projektu:

základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom predloženého projektu je získať ďalšie poznatky o úlohe nervového systému v etiopatogenéze nádorových chorôb, a to využitím animálnych modelov dvoch nádorov s vysokou incidenciou u ľudí, mamárneho karcinómu a melanómu. Chceme sledovať vplyv narušenia signalizácie medzi nervovým systémom a tkanivom nádoru na progresiu nádorovej choroby.

Pre dosiahnutie stanoveného cieľa plánujeme:

- 1) zistiť, ako zmena v denzite inervácie tkaniva nádoru (aplikáciou vybraných látok, konkrétne nervový rastový faktor (NGF), protilátka proti NGF a retrográdny značkovač TrueBlue priamo do tkaniva nádoru) ovplyvní progresiu mamárneho karcinómu (objem nádorového tkaniva, imunologické parametre, vybrané parametre v mozgu);
- 2) zistiť, ako ovplyvní systémové podávanie β -blokátora (propranololu) rast mamárneho karcinómu a melanómu, a kedy je optimálne začať s jeho aplikáciou, aby bol efekt čo najvýraznejší. Zároveň študovať možný preventívny účinok podávania propranololu na incidencia a progresiu experimentálneho melanómu.

Prínos projektu:

Podrobnejšie poznanie úlohy nervového systému pri nádorovom raste môže vytvoriť podklad pre zavedenie takých terapeutických modalít do onkológie, ktoré zlepšia kvalitu života onkologických pacientov a predĺžia ich prežívanie. Predložený projekt je koncipovaný tak, aby získané výsledky mali čo najväčšiu výpovednú hodnotu a boli využiteľné v klinickej praxi.

Počet a druh použitých zvierat:

- laboratórne potkany, samice kmeňa Sprague-Dawley v počte 178 jedincov
- myši, samce kmeňa C57Black/6J v počte 172 jedincov.

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

Vzhľadom nato, že laboratórnym potkanom sa bude podávať chemický karcinogén MNU indukujúci vznik mamárneho karcinómu a laboratórnym myšiam sa budú subkutánne injikovať melanómové B16-F10 nádorové bunky, ktoré vyvolajú rast experimentálneho melanómu, budú zvieratá vystavené nepriaznivému účinku vyvíjajúceho sa nádoru, čo bude mať za následok istý diskomfort a nepohodlie. Avšak, z našich predošlých skúseností, ako aj z prác iných autorov využívajúcich dané nádorové modely (Overwijk a Restifo,

2001; Ya a spol., 2015, Macejová a Brtko, 2001) vieme, že tieto typy nádorov nevyvolávajú tvorbu metastáz a pokiaľ sa nenechajú prerásť do veľkých rozmerov (teda nezačnú byť nekrotické, ulcerovať a krváčať) nespôsobujú zvieratám komplikácie. Vzniknuté nádory je možné u zvierat palpačne detegovať cca na 80 - 100 deň života zvierat pri mamárnom karcinóme a cca na 5 – 10 deň pri melanóme a do veľkosti 1 cm³ narastie mamárny karcinóm v priebehu cca 30-50 dní a melanóm v priebehu 14 až 21 dní. V tomto čase nezvykne nádor spôsobovať zvieratám väčší diskomfort. Preto je vhodné usmrtiť zvieratá pred týmto stavom. V predkladanom projekte plánujeme zvieratá humánne usmrcovať do 180 dňa života zvierat pri mamárnom karcinóme a do 30. – 40. dňa po podaní nádorových buniek pri experimentálnom melanóme.

Ďalšie možné následky môžu byť prítomné u zvierat, ktoré podstúpia chirurgický zákrok, a to podanie vybraných látok do tkaniva nádoru, ktoré tiež môžu ovplyvniť ich zdravotný stav. Hoci budú tieto zákroky u zvierat vykonané v anestézii, predpokladáme ich krátkodobý nepriaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat (predovšetkým pooperačná bolesť). V pooperačnom období podľa potreby podáme analgetikum Carprofen 5 mg/kg/deň intraperitoneálne. Všetkým predvídateľným zdravotným komplikáciám sa budeme snažiť zabrániť, prípadne ich zmierniť.

Predpokladaná úroveň krutosti:

MANIPULÁCIA SO ZVIERATAMI	MIERA KRUTOSTI
váženie zvierat	slabá
označovanie zvierat (tetovanie vonkajšej ušnice myší, označenie potkanov využitím permanentných popisovačov na chvoste)	slabá
vyholenie zvierat pred inokuláciou nádorových buniek použitím elektrického holiaceho strojčeka	slabá
podávanie látok (s.c. inokulácia nádorových buniek, i.p. podávanie anestézie)	slabá
zisťovanie prítomnosti nádorov pohmatom v oblasti podania nádorových buniek, resp. MNU a meranie jeho veľkosti posuvným meradlom	slabá
individuálne ustajnenie zvierat so zachovaním vzájomného vizuálneho kontaktu.	slabá
opakované i.p. podávanie MNU, fyziologického roztoku a propranololu	stredná
rast mamárneho karcinómu alebo melanómu	stredná
aplikácia vybraných látok priamo do tkaniva mamárneho karcinómu	stredná
CELKOVÁ KLASIFIKÁCIA	STREDNÁ

Súlad s požiadavkami „3R“

1. Nahradenie zvierat

Úlohu nervového systému v procesoch súvisiacich so vznikom a progresiou nádorov je možné študovať len na animálnom modeli s dostatočne vyvinutým nervovým systémom. Preto nie je možné navrhovaný experiment realizovať na systematicky nižšom druhu živočíchov a ani za využitia počítačovej simulácie. Je

nevyhnutné využiť laboratórne potkany, samice kmeňa Sprague-Dawley a myši, samce kmeňa C57Black/6J, keďže predstavujú ideálny model pre chemickú indukciu mamárneho karcinómu a indukciu melanómov subkutánnou aplikáciou B16-F10 melanómových nádorových buniek.

2. Redukcia počtu zvierat

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich experimentov vieme, že incidencia experimentálneho mamárneho karcinómu indukovaného u samíc potkanov kmeňa Sprague-Dawley a melanómu indukovaného s.c. aplikáciou B16-F10 melanómových buniek u samcov laboratórnych myší kmeňa C57Black/6J je veľmi vysoká (viac ako 80%). Keďže rovnaký protokol budeme využívať na indukciu nádorov aj v predkladaných postupoch, počet experimentálnych zvierat bude redukovaný na minimum nevyhnutné z hľadiska štatistických analýz pre získanie vedecky hodnoverných a validných výsledkov. Avšak, pre získanie biologického materiálu vhodného pre imunohistochemické spracovanie a spracovanie biochemickými metódami ako sú PCR, western blot a ELISA, bude potrebné navýšenie počtu zvierat, keďže zvieratá budú musieť byť na konci experimentov usmrtené dvomi rôznymi spôsobmi, konkrétne dekapitáciou bez použitia anestézie a podaním anestetika (pentobarbital, 50 mg/kg hmotnosti zvieratá, i.p.) s následnou transkardiálnouperfúziou. Skupina Absolútna kontrola (zvieratá bez akéhokoľvek zásahu) je do experimentu zahrnutá pre potreby určenia východiskových (bazálnych) hodnôt pri stanovovaní parametrov v krvi, resp. plazme a tkanivách, ako aj pre poznanie vývoja normálnych hodnôt hmotnosti zvierat a príjmu potravy a vody.

Počty zvierat s indukovaným mamárnym karcinómom, ktorým budú priamo do tkaniva nádoru podané vybrané látky, sú navýšené. Je to z dôvodu invazívneho postupu, ktorý bude u nich vykonaný. To bude vyžadovať rezervu v počte zvierat, keďže podanie nemusí byť u všetkých zvierat 100% úspešné.

3. Zjemnenie

Zvieratá budú držané v klietkach v skupinách za prísunu peletovanej stravy a vody *ad libitum*, čo im umožní plne realizovať prirodzené formy správania, vrátane sociálneho. U zvierat bude po aplikácii chemického karcinogénu alebo po aplikácii nádorových buniek denne sledovaný ich zdravotný stav a pohmatom v oblasti prsnej žľazy (u potkanov) a v mieste podania nádorových buniek (u myší) sa budú vyšetrovať na prítomnosť nádoru. V priebehu experimentov sa bude pravidelne zaznamenávať aj telesná hmotnosť zvierat, množstvo prijatej potravy a vody.

Pri mamárnom karcinóme indukovanom u potkanov podaním MNU sa tento vyvíja zvyčajne na 30-50 deň po aplikácii chemickej látky. V čase 50 dní po detekcii nezvykne nádor spôsobovať zvieratám väčší diskomfort. Avšak, pokiaľ sa nechá prerásť do veľkých rozmerov, nádor začne byť nekrotický, ulcerovať a krváčať. Preto je vhodné usmrtiť zvieratá pred týmto stavom. V predkladanom projekte plánujeme zvieratá humane usmrcovať do 180. dňa po podaní karcinogénu. Ak sa stane, že nádor bude ulcerovať skôr, jeho priemer výrazne zväčší (nad 7cm³) alebo akýmkoľvek iným spôsobom ovplyvní normálne správanie zvierat, následne na základe dosiahnutého skóre určeného podľa číselného ohodnotenia ukazovateľov stanovených v tabuľke s humane end points (príloha č.3) pristúpime ku humánnemu ukončeniu postupov podaním letálnej dávky anestetika (pentobarbital, 100 mg/kg hmotnosti zvieratá).

Pri melanómoch sa tieto budú každý druhý deň merať posuvným meradlom a okrem veľkosti nádoru budeme monitorovať aj jeho stav. Z našich predošlých skúseností, ako aj z prác iných autorov využívajúcich daný nádorový model (Overwijk a Restifo, 2001; Ya a spol., 2015) vieme, že tento typ nádorov po s.c. aplikácii nádorových buniek je možné palpačne detegovať cca na 5 – 10 deň a do veľkosti 1 × 1 × 1 cm nádor narastie v priebehu 14 až 21 dní. V tomto čase nezvykne nádor spôsobovať zvieratám väčší diskomfort.

Podobne ako v prípade mamárneho karcinómu, keď sa nechá prerásť do veľkých rozmerov, nádor začne byť nekrotický, ulcerovať a krváčať. Preto je vhodné usmrtiť zvieratá pred týmto stavom. V predkladanom projekte plánujeme zvieratá humane usmrcovať do 30. - 40. dňa po podaní nádorových buniek. Ak sa stane, že nádor bude ulcerovať skôr, jeho priemer výrazne zväčší (nad 1 cm³), alebo akýmkoľvek iným spôsobom ovplyvní normálne správanie zvierat, následne na základe dosiahnutého skóre určeného podľa číselného ohodnotenia ukazovateľov stanovených v tabuľke s humane end points (príloha č.3) pritúpime ku humánnemu ukončeniu postupov podaním letálnej dávky anestetika (pentobarbital, 100 mg/kg hmotnosti zvierat'a).

Počas chirurgických zásahov (aplikácia látok do tkaniva nádoru) budú zvieratá v celkovej anestézii, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najmenšiu možnú mieru. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Po operačných zásahoch budú zvieratá ponechané na vyhrievacích podložkách do doznenia účinkov anestézie. Následne budú preložené do chovných kliebok, kde budú pravidelne monitorované. V pooperačnom období podľa potreby podáme analgetikum Carprofen 5 mg/kg/deň intraperitoneálne. Podávanie β -blokátora sa uskutoční bez anestézie, nakoľko ide o minimálne invazívny zákrok, ktorý aj keď bude opakovaný, pri aplikácii skúseným pracovníkom vyvoláva minimálny diskomfort u zvierat.

Všetky postupy budú uskutočňované tak, aby zvieratá čo najmenej trádali. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Spätné posúdenie projektu:

nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu:

Obnovenie expresie kaveolínu-1 ako možná forma terapie monokrotalínom indukovanej pľúcnej hypertenzie

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

1115/15-221, predĺženie lehoty 3997/16-221

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom pokusu bolo zistiť možný terapeutický efekt obnovy expresie CAV-1 pomocou špecifických liečiv a porovnať ho so štandardnou terapiou, ktorej účinok na expresiu kaveolínu-1 nie je známy v experimentálnom modeli pľúcnej artériovej hypertenzie. Zároveň sa sledoval vzťah medzi poškodenou funkciou PK a expresiou CAV-1 v tkanive pravej komory.

Prínos z vykonaného projektu:

Napriek veľkej pozornosti zdravotníckeho systému a neustálemu vývoju a dostupnosti nových liekov je liečba kardiovaskulárnych ochorení oblasťou, kde je naďalej potrebné hľadanie nových cieľov farmakologického zásahu, aby bolo možné implementovať do farmakoterapie účinnejšie a bezpečnejšie liečivá. Táto výzva je ešte naliehavejšie v prípade zriedkavých kardiovaskulárnych ochorení, ako je aj pľúcna artériová hypertenzia (PAH), ktoré sú často mimo výskumných stratégií súkromného sektora, keďže návratnosť vynaložených financií na výskum je veľmi otázná. V tomto projekte sme identifikovali kaveolín-1 (CAV-1) ako potenciálneho kandidáta na budúce terapeutické ciele, keďže, ako je známe z patomechanizmov iných ochorení, táto signálna kaskáda ma silné regeneračné účinky.

Prínosom projektu bolo získanie poznatkov o vzťahu medzi expresiou CAV-1 a rozvojom PAH u monokrotalínom indukovanej pľúcnej hypertenzie. Projekt bol realizovaný v súlade s navrhnutým a schváleným plánom. Vývoj hmotnosti zvierat sa signifikantne nelíšil medzi monokrotalínovou skupinou (MCT) a žiadnou zo skupín s aplikovanou terapiou. Žiadna z terapií významne neovplyvnila prežívanie potkanov.

V biometrických parametroch sme zaznamenali signifikantné zvýšenie hmotnosti srdca a pravej komory v skupinách MCT, M+ROS (rosiglitazón) a M+SIL (sildenafil) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Genisteín (GEN) zmiernil nárast absolútnej hmotnosti pravej komory, avšak relatívna pravokomorová

hmotnosť bola signifikantne zvýšená. Hmotnosť ľavej komory ostala zachovaná vo všetkých skupinách. Absolútna hmotnosť pľúc bola zvýšená v skupine M+GEN a M+SIL, kým relatívna hmotnosť bola zvýšená v skupine MCT, M+GEN a M+SIL. Absolútna hmotnosť obličiek bola signifikantne zvýšená v skupinách MCT, M+ROS, M+GEN a M+SIL v porovnaní s kontrolnou, avšak relatívna hmotnosť obličiek nepreukázala žiadne zmeny.

Aplikovaná terapia zachovala saturáciu kyslíkom iba v skupinách M+PIO, M+GEN a M+SIL porovnateľne s kontrolnou skupinou. O₂ saturácia bola zároveň signifikantne zvýšená vo všetkých terapeutických skupinách oproti monokrotalínovým potkanom. Dychová frekvencia preukázala iba trend nárastu vo všetkých liečených skupinách, kým u MCT zvierat bola signifikantne zvýšená oproti kontrolám.

Žiadna z použitých terapií nemala vplyv na proteínovú expresiu kaveolínu-1. Avšak GEN a ROS dokázali udržať hladinu pTyr14CAV-1 na porovnateľnej úrovni ako v CON skupine v štádiu rozvinutej pľúcnej hypertenzie.

Účinnosť terapie genisteínom bola preukázaná na zmiernení nárastu hmotnosti pravej komory, poklesu saturácie kyslíkom a nárastu dychovej frekvencie oproti monokrotalínovej skupine. Genisteín ďalej zvýšil proteínovú expresiu fosforylovanej izoformy kaveolínu-1 (pTyr14CAV-1).

Rosiglitazónová terapia zabránila nárastu hmotnosti pľúc po aplikácii monokrotalínu a taktiež zmiernila pokles saturácie kyslíkom a zvýšenie dychovej frekvencie v porovnaní s MCT skupinou. Rosiglitazón zároveň zvýšil proteínovú expresiu pTyr14CAV-1.

Z použitých terapií sme najvýraznejšie výsledky zaznamenali po aplikácii tiazolidíndiónu (ROS) a izoflavónu (GEN). Terapia týmito látkami výrazne zvýšila hladinu fosforylovanej izoformy kaveolínu-1, ktorá je práve aktívna. Zachovanie fosforylácie CAV-1 tak mohlo viesť k inhibícii nadmernej aktivácie eNOS a zabráneniu tvorby oxidačného stresu a poškodenia pravej komory, či pľúc a tento benefit bol pozorovaný na klinickej úrovni v monokrotalínovom modeli v štádiu už rozvinutej pľúcnej hypertenzie.

Druhy použitých zvierat a ich počty : Potkany, samce rodu Wistar 300 ks

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

Vykonalí sme experimenty, v ktorých sme hodnotili vplyv monokrotalínom-indukovanej PAH na funkciu pravej komory, t.j. sme vykonali experimenty *in vivo*, teda na celom zvierati. V experimente vykonali intraperitoneálnu aplikáciu anestetika (Avertin). Zvieratá mohli pri intraperitoneálnej aplikácii anestetika pociťovať krátkodobú bolesť, ale nepozorovali sme neprimerané známky narušenia ich pohody, ani celkového stavu zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca boli vykonané v hlbokoj celkovej anestézii, po ktorej zvieratá nenadobudli vedomie a boli po meraniach humánne utratené. Potvrdilo sa výrazné poškodenie funkcie srdca, v zmysle zlyhania pravej komory a jeho prejavov ako dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti a úmrtnosti. Použitý experimentálny model rozvíjal zlyhanie pravej komory postupne v priebehu 4 týždňov. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu boli zvieratá humánne utratené. Z tohto dôvodu boli zvieratá denne sledované a pokiaľ začali prejavovať klinické symptómy poškodenia srdca (dýchavičnosť, zníženie telesnej

hmotnosti) boli okamžite uvedené do anestézie a boli použité v experimente (bez ohľadu na dobu trvania experimentu) a utratené tak, aby bolo ich prípadné utrpenie čo najviac eliminované.

Predpokladaná úroveň krutosti:

krutá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie:

Nakoľko išlo o experimenty, v ktorých sa hodnotil vplyv PAH na rozvíjajúce sa zlyhanie srdca, nebolo možné pokus vykonať bez použitia zvierat a použiť alternatívnu metódu. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako kultúry buniek, na ktorých je nemožné relevantne posúdiť funkciu srdca ako celku s ňou súvisiace patomechanizmy a molekulárne pozadie.

2. Obmedzenie:

V experimentoch bol použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet zvierat zahŕňal predpokladanú mortalitu po podávaní monokrotalínu, ktorá podľa literatúry predstavuje 25-30 percent, ako aj prípadnú perioperačnú mortalitu, spojenú s invazívnym zákrokom.

3. Zjemnenie:

Výsledky jednotlivých častí štúdie boli priebežne (a niektoré molekulárno-biologické experimenty ešte budú) vyhodnocované. v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí sme boli pripravený experiment ukončiť a následne predložiť nový projekt. Nezaznamenali sme však žiadne nevhodné neočakávané udalosti v priebehu realizácie postupov. Hemodynamické merania boli realizované u zvierat v celkovej anestéze, všetky zvieratá boli humánne utratené oxidom uhličitým.

Projekt podliehal opätovnému schvaľovaniu: áno nie

V Bratislave 21.9.2017

4

Netechnické zhrnutie projektu

497/19-221/3

Názov projektu: Indukcia BMPR-II kaskády ako možná forma terapie monokrotalínom indukovanej pľúcnej hypertenzie

Kľúčové slová: pľúcna hypertenzia, potkan, monokrotalín

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je zistiť vplyv tiloronu a porovnať ho s tromi odlišnými prístupmi štandardnej terapie (sildenafil, macitentan, treprostinil) na expresiu komponentov BMPR-II kaskády a na základné ukazovatele PAH (funkčnosť pravej komory, gravimetrické parametre srdca a pľúc), vrátane pľúcnej fibrózy.

Prínos z vykonaného projektu:

Pľúcna artériová hypertenzia je nevyliciteľné ochorenie s nízkou kvalitou života a skorou mortalitou. Súčasná liečba nerieši príčinu ochorenia. Nové farmakoterapeutické postupy zamerané na BMPR-II kaskádu by mohli predstavovať nový cieľ ovplyvnenia ochorenia a mohli by prispieť k zlepšeniu kvality života a prežívania pacientov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty : Potkany, samce rodu Wistar, n=555

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

V experimentoch sa bude hodnotiť vplyv monokrotalínom-indukovanej PAH na funkciu pravej komory a pľúcnu cirkuláciu, preto je potrebné vykonať experiment in vivo, teda na celom zvierati. Plánuje sa intraperitoneálna aplikácia anestetika (Avertin). Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii anestetika pociťovať krátkodobú bolesť, ktorá nebude významne narušovať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokoj celkovej anestézii, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené. Celkovo sa očakáva výrazné poškodenie funkcie srdca, v zmysle zlyhania pravej komory a jeho prejavov ako dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti a úmrtnosť na úrovni 30-50%. Použitý experimentálny model rozvíja zlyhanie pravej komory postupne v priebehu 4 týždňov. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené. Z tohto dôvodu budú zvieratá denne sledované a pokiaľ začnú prejavovať klinické symptómy poškodenia srdca (dýchavičnosť, zníženie telesnej hmotnosti), budú okamžite uvedené do anestézie (bez ohľadu na dobu trvania experimentu) a utratené tak, aby bolo ich prípadné utrpenie čo najviac eliminované.

Predpokladaná úroveň krutosti:

váženie zvierat, kontrola zdravotného stavu – slabá
p.o. gavážovanie sildenafilu, macitentanu – stredná
s.c. aplikácia monokrotalínu, treprostinilu – stredná
i.p. aplikácia anestetika avertínu, tiloronu – stredná
dušnosť a zníženie fyzickej výkonnosti po dlhodobom pôsobení monokrotalínu – stredná
prípadná mortalita 4 týždne po monokrotalíne – krutá

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv monokrotalínu (a pľúcnej hypertenzie) na orgánový systém (malý krvný obeh) na rôznych úrovniach (histologické zmeny, molekulárno-biologické parametre, EKG, bazálnu a beta adrenergicky stimulovanú funkciu pravej komory in situ), nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako in vitro pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, najmä v rámci pravej komory ako celku. Rovnako nemožno hodnotiť komplexné deje, akými je rozvoj pľúcnej hypertenzie, so sprievodnými etiopatologickými a kompenzačnými funkčnými a molekulárnymi zmenami vo viacerých orgánoch súčasne, a pod vplyvom farmakoterapie.

2. Obmedzenie

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet $n=24$ v skupinách MCT zahŕňa možnú mortalitu po podávaní monokrotalínu, ktorá podľa literatúry predstavuje 30-50 percent.

3. Zjemnenie

Hemodynamické merania budú vykonávané v celkovej anestézii, zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým. Cieľom nie je štúdium mortality, ale je nutné navodiť poškodenie pravej komory a pľúcnej cirkulácie, ktoré sa budú analyzovať. Preto sa najmä v poslednom týždni očakáva dušnosť, zníženie fyzickej výkonnosti, ktoré môže zviera obmedzovať. Preto budú postupy humánne ukončené pred plánovaným skončením v prípade, ak budú zvieratá vykazovať akútne zhoršenie stavu – zanedbaná srst', apatia, miznutie sociálnych foriem správania, neschopnosť prijímať potravu, náhly úbytok hmotnosti o 15%-20% počas 24 hodín (zvieratá budú vážené každý deň), zúženie očníc, zavreté oči.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Názov projektu: Ovplynenie symptómov experimentálne vyvolanej alergickej astmy a remodelácie dýchacích ciest modulátormi aktivity iónových kanálov.

Kľúčové slová: bronchiálna astma, iónové kanály, remodelácia, hyperreaktivita, kašeľ

Opodstatnenosť, cieľ a predpokladaný prínos projektu: Celosvetové štatistiky uvádzajú, že bronchiálnou astmou trpí viac ako 30 miliónov ľudí, ich počet narastá rovnako ako aj počet pacientov, ktorí nereagujú na liečbu dostupnú v súčasnosti. Ide o chronické zápalové ochorenie, v ktorom hrajú dôležitú úlohu bunky imunitného systému a dýchacích ciest. Ich činnosť riadia rôzne typy iónových kanálov a je reálny predpoklad, že látky schopné ovplyvniť ich aktivitu môžu predstavovať alternatívu súčasnej liečby.

Cieľom projektu je identifikovať modulátor/modulátory aktivity iónových kanálov, ktorý by bol schopný selektívne ovplyvniť priebeh alergického zápalu a tým aj reaktivitu obranných mechanizmov DC a následnú remodeláciu. Takéto liečivo by mohlo znamenať výrazný posun v terapii astmy, pretože by svojim potenciálom predstihlo súčasné dostupné antiastmatiká.

Použitie zvierat v postupoch:

Navrhované postupy projektu počítajú s použitím outbredných morčiat kmeň DH/TRIK s hmotnosťou 200-350 g v celkovom počte 312 jedincov.

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami ako aj medzinárodne zavedenými osvedčenými metódami v starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne a zodpovedné zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma, ale aj v zahraničí. Z hľadiska dodržiavania zásad práce so zvieratami neboli voči nim vznesené žiadne námietky, či už na odborných fórach v rámci diskusií alebo v oponentských posudkoch publikovaných článkov. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k účelnej farmakoterapii. Riešitelia preto považujú navrhované metódy za vhodné aj pre realizáciu predkladaného projektu.

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

Replacement- pre postupy v projekte boli vybraté morčatá, ktorých výber vychádzal z našich dlhoročných skúseností. Vzhľadom na receptorové zastúpenie v DC patria morčatá k najvhodnejším zvieratám, používaným v experimentálnom modeli alergickej astmy. Charakter postupov nedáva možnosť dosiahnuť požadovaný, reprodukovateľný a validný výsledok inou dostupnou metódou bez použitia zvierat.

Reduction- Navrhovaný počet zvierat použitý v postupe (celkovo 312) bude potrebný na získanie významných výsledkov po štatistickom hodnotení a akceptovaní vedeckou komunitou (1 skupina = vždy maximálne 8 zvierat). Tento počet bol výrazne zredukovaný o potrebné kontrolné skupiny, z dôvodu doplnenia výsledkov realizovaných na morčatách z iných postupov. V jednotlivých experimentálnych skupinách použijeme maximálne 8

zvierat. Tento počet je ešte akceptovateľný pre štatistickú validáciu a reprodukovateľnosť výsledkov. Počas riešenia projektu použijeme na sledovanie zmien reaktivity dýchacích ciest, na sledovanie kinetiky cilií respiračného epitelu, zápalovej reakcie a antiremodelačného účinku metódu *in vitro*, ktoré nám umožnia ďalšiu výraznú redukciu počtu použitých zvierat.

Refinement - Postupy sa budú vykonávať *lege artis* na neanestézovaných morčatách. Cieľom senzitivizácie je vyvolanie podobných klinických príznakov, ktorými sa prejavuje astma u ľudí – t.j. ide o stavy krátkodobej dušnosti. Možné závažné zhošenie dýchania bude riešené použitím tzv. záchranných inhalačných bronchodilatancií, ktoré majú okamžitý účinok a podobným spôsobom sa používajú v klinickej praxi. Pri prejavoch bolestivosti vyjadrených human endpoint score 10 a viac (maximálne však 14) podáme analgetiká. U morčiat ako spoločenských zvierat bude zabezpečené skupinové usporiadanie v klietkach, zachované pôvodné rozdelenie do skupín a povolené budú úkrytové hračky ako obohacujúci parameter.

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

Vyvolanie chronického alergického zápalu dýchacích ciest a remodelačných zmien vyžaduje opakované podávanie alergénu intraperitoneálnou a subkutánnou injekciou a opakovaným vdychovaním tejto látky. Je preto možné, že zvieratá budú počas podávania injekcií pociťovať krátkodobú bolesť, prípadne prechodný diskomfort a nepohodlie. Pocit diskomfortu a krátkodobého nepohodlia je možné aj pri inhalačnom podaní alergénu. Tento alergén vyvoláva u zvierat príznaky podobné ľudskej bronchiálnej astme s epizódami krátkodobej dýchavičnosti. S výnimkou kontrolných senzitivizovaných zvierat bez špecifickej medikácie bude všetkým ostatným senzitivizovaným skupinám podávané liečivo, ktoré sa v klinickej praxi bežne používa na prevenciu týchto záchvatov (pozitívne kontrolné skupiny zvierat) alebo liečivo, ktorého mechanizmus účinku sa spája s ovplyvnením aktivity sledovaných iónových kanálov. Početné literárne zdroje však naznačujú, že uvedené „experimentálne“ liečivá by mali viesť k podobnému účinku ako bežne používané antiastmatiká, t.j. potlačeniu vzniku prechodnej dýchavičnosti. Na základe uvedeného tieto postupy a stav zvierat z hľadiska krutosti označujeme ako **miernu až strednú**, resp. **strednú krutosť**. Krátkodobé vystavenie zvierat účinku látok vyvolávajúcich bronchokonstrikciu a kašeľ tiež pre zvieratá predstavuje istý diskomfort a nepohodlie a preto postupy z hľadiska krutosti hodnotíme ako **mierne až stredne** kruté. Keďže projekt je naplánovaný tak, že takmer u všetkých skupín zvierat budú vykonané viaceré manipulácie charakterizované miernou-strednou, resp. miernou a strednou krutosťou, celkovo hodnotíme stupeň krutosti postupov vykonávaných na zvieratách ako **stredne** krutý.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Charakteristika postupu	Úroveň krutosti
Váženie zvierat	mierna
Jednorazová alebo opakovaná p.o./inhalačná aplikácia liečiv	mierna
Opakovaná s.c., i.p. a inhalačná aplikácia ovalbumínu	mierna - stredná
Vyvolanie stavu podobného ľudskej astme opakovaným podaním ovalbumínu	stredná
Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestézii	mierna bez možnosti zotavenia

Umiestnenie zvierat'a do bodypletyzmografu	mierna
Inhalácia tusigénnych, resp. bronchokonstrikčných látok v bodypletyzmografe	mierna
Vyvolanie krátkodobej bronchokonstrikcie histamínom a metacholínom	stredná
Vyvolanie krátkodobej epizódy kašľa miernej až strednej intenzity	mierna
Predpokladaná celková úroveň krutosti	STREDNÁ

Human endpoint: nastane v prípade zhoršeného zdravotného stavu zvierat'a, ktorý sa bude hodnotiť špecifickým dotazníkom vtedy, ak počet bodov v ňom narátaných bude 15 a viac. Postup bude ukončený humánnou eutanáziou s súlade s platnou legislatívou a pod dohľadom veterinárneho lekára.

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

Príloha č. 2
Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Účinok blokovania inhibičných molekúl na interneuronálne prepojenia a prerastanie axónov po cervikálnom a torakálnom poškodení miechy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 415/19-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kompresia miechy, chronická poškodenie, gliová jazva, Chondroitináza ABC, prerastanie axónov.

Účel projektu*: Základný výskum
Translačný alebo aplikovaný výskum
Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z.z.)
Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat
Ochrana druhov
Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie
Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu: (napr. nie sú ešte výsledky z takéhoto výskumu, nutnosť jeho vykonania z hľadiska vedy, z klinického hľadiska)

Špecifický cieľ 1:

Súčasná neuroanatomická a neurofyziológická štúdia naznačujú, že pre-frenické interneuróny môžu prispievať k modulácii aktivity frenických motoneurónov (PhMN) v mieche v norme a po jej poškodení omnoho viac, ako sa pôvodne predpokladalo. Zdá sa, že tieto bunky sú súčasťou neurálneho substrátu, ktorý moduluje nástup a stupeň včasnej a dlhodobej obnovy PhMN. Z toho dôvodu cieľom tejto štúdie je identifikovať cervikálne pre-frenické interneuróny, ktoré sú funkčne spojené s neurónmi respiračného jadra (rVRG) v predĺženej mieche a opakovanou subpiálnou aplikáciou v chronickom štádiu poškodenia (aplikáciou Chondroitinázy ABC nad miesto lézie) potlačiť tvorbu gliovej jazvy a posilniť PhMN respiračnú sieť.

Špecifický cieľ 2:

Cieľom experimentov zahrnutých v druhej časti projektu je potlačiť tvorbu gliovej jazvy po Th9 kompresii (opakovanou subpiálnou aplikáciou Chondroitinázy ABC v chronickom štádiu poškodenia) a podporiť rast a plasticitu neurónov na posilnenie a upevnenie funkčne významných neurónových spojení, ktoré podporia regeneráciu axónov a zlepšia funkčný stav po traume miechy. Subpiálna aplikácia Chondroitinázy ABC, ktorá umožňuje rozsiahlu penetráciu v parenchýme miechy, a ktorá nevyžaduje priamy prienik ihly do miechového tkaniva (Tadokoro et al., J Vis Exp. 2017 Jul 13;(125). doi: 10.3791/55770), môže byť využitá v predklinických štúdiách.

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

Traumatické poškodenie miechy predstavuje závažný klinický problém, spojený s celoživotným hendikepom. Z experimentálnych štúdií vyplýva, že sekundárne procesy, medzi ktoré patrí lokálny edém, ischemia, iónová nerovnováha (ako zvýšená hladina vnútrobunkového vápnika a sodíka), uvoľnenie toxických a zápalových látok do okolia poškodeného tkaniva, vedú k degenerácii prvotným inzultom len čiastočne poškodených neurónov a ich výbežkov, ktoré sa nachádzajú v blízkosti miesta poškodenia. Počas posledných dvoch desaťročí sa podarilo dosiahnuť výrazný pokrok v pochopení

molekulárnych a bunkových procesov vyvolaných poškodením a detailnejšie porozumieť kľúčovým mechanizmom, ktoré prispievajú k poškodeniu tkaniva a zlyhaniu regenerácie čiastočne poškodených neurónov. Jedným z hlavných cieľov SCI výskumu je obnova traumou prerušených neurónových spojení. U pacientov s neúplným poškodením sa môže reinervácia na krátke vzdialenosti realizovať vetvením axónov a tvorbou nových synaptických kontaktov s neurónmi. Je známe, že interneuróny sa môžu podieľať pri sprostredkovaní zlepšenia behaviorálneho správania vybudovaním nových intraspínálnych prepojení. Avšak, neurálny substrát, ktorý tvorí podklad pre spontánnu alebo terapeuticky zosilnenú funkčnú regeneráciu po poranení miechy zostáva málo objasnený. Z tohto dôvodu je potrebné hlbšie preskúmať synaptické okruhy spojené s procesmi obnovy, a tiež odkryť, ako môže prepojenie v rámci rôznych intraspínálne funkčných domén modulovať neuroplasticitu po poranení miechy.

Po poranení miechy dochádza v mieste lézie k akumulácii špecializovaných gliových buniek, ktoré majú za normálnych okolností pre neuróny podpornú funkciu. Tieto bunky sa podieľajú na tvorbe tzv. gliovej jazvy, ktorá je hlavnou prekážkou pre regeneráciu miechy. Reaktívne gliové bunky vytvárajú fyzikálnu a biochemickú bariéru pre opätovný rast a prerastanie axónov. Molekuly, ktoré sú zodpovedné za inhibíciu axonálneho rastu sa koncentrujú predovšetkým v mieste lézie. Chondroitín sulfát proteoglykány (CSPGs), ktoré sú asociované s extracelulárnou matrix a astrocytmi je možné blokovať pomocou Chondroitinázy ABC. Účinky (parenchymálnej a intratekálnej aplikácie) Chondroitinázy ABC do miesta poranenia sa experimentálne študujú veľmi intenzívne. Štúdie ukazujú, že Chondroitináza ABC, ktorá je aplikovaná priamo do parenchýmu predstavuje značné riziko ďalšieho poškodenia miechy. Intratekálna aplikácia umožní prienik Chondroitinázy ABC do intratekálneho priestoru, ale nie priamo na miechu, t.j. až pod pia mater, ktorá tesne prilieha k mieche bráni prieniku liečiva priamo k mieche. Veľkou limitáciou Chondroitinázy ABC tiež je, že tento enzým je termolabilný a do 7-ich hodín po aplikácii do tkaniva miechy je neaktívny. Doposiaľ uskutočnené aplikácie síce umožnia obmedzený rast axónov, ale nedokážu zabezpečiť účinnú regeneráciu axónov. Z toho dôvodu je spôsob aplikácie Chondroitinázy ABC mimoriadne dôležitý. Subpiálna aplikácia, ktorá bude použitá v našom experimente umožní rozsiahlu penetráciu Chondroitinázy ABC priamo pod pia mater. Predpokladáme, že bolusová dávka, ktorá sa aplikuje opakovane nad miesto lézie (C5 segment) umožní rozsiahlu penetráciu enzýmu až k frenickým motoneurónom v krčnej mieche a tiež v respiračných jadrách (rVRG a DRG) predĺženej miechy a pozitívne ovplyvní bulbospínálne prepojenie interneurónov s respiračnými bunkami frenického jadra. Toto zistenie môže zohrať významnú úlohu pri riešení problémov spojených s poruchami, ktoré sa objavujú po traumatických léziách krčnej miechy. Tiež očakávame, že subpiálna aplikácia Chondroitinkinázy ABC po Th9 kompresii podporí regeneráciu axónov, ovplyvní funkčne významné neurónové prepojenia (komisurálne, propriospínálne) a umožní funkčnú obnovu. Poznatky, získané v rámci projektu môžu významným spôsobom prispieť k objasneniu mechanizmov, ktoré sa uplatňujú v interneurónovej komunikácii a regenerácii axónov po traumatických léziách miechy.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Pre porovnanie poškodenia nervového tkaniva po C5 a Th9 kompresii by bolo určite vhodnejšie použiť rovnaké pohlavie experimentálnych zvierat, ktoré by umožnilo dosiahnuť jednoznačne reprodukovateľné výsledky. V našich experimentoch ide predovšetkým o účinok subpiálnej aplikácie Chondroitinázy ABC, ktorý sa môže reprodukovať oddelene po C5 a Th9 kompresii. Nakoľko v experimentoch s Th9 kompresiou je nevyhnutné použiť samice (lepšie znášajú problémy s vyprázdňovaním močového mechúra), v ostatných experimentoch, ktoré nespôsobujú tieto problémy uprednostňujeme samce. V experimentoch je plánované použiť dospelé potkany laboratórne (*Rattus norvegicus*), Wistar, v počte 120 jedincov (samce-48; samice-72) na celú dobu riešenia. Samce budú použité v experimentoch, v ktorých bude zvieratám navodená jednostranná C5 kompresia. Na experimentálne navodenú Th9 kompresiu budú použité samice.

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

V experimente sa použijú dva kompresné modely poranenia miechy (jednostranná C5 kompresia a Th9 kompresia). **Jednostranná kompresia C5 segmentu miechy silou 40 g/1 min** spôsobí na strane lézie spasticitu prednej končatiny a čiastočnú paraplégiu zadnej končatiny so zachovanými miechovými reflexmi. Kompresia bude uskutočnená z dorzálnej strany miechy. Tlak na miechu bude krátky (1 min) a vyvolá jednostranné poškodenie, ktoré sa rozšíri v krčnej mieche kranio-kaudálne. V priebehu 4-5 dní dôjde k úplnej funkčnej obnove zadnej končatiny. Jednostranná C5 kompresia prostredníctvom tiaže závažia nepoškodí dura mater. Zvieratá, ktoré sú po chirurgickom zákroku dokážu prijímať potravu pomocou zdravej prednej končatiny a dokážu sa premiestňovať. **Kompresia na úrovni Th9 segmentu silou 40 g/15 min** spôsobí trvalú paraplégiu zadných končatín s čiastočne zachovanými miechovými reflexmi. Kompresia bude uskutočnená z dorzálnej strany miechy, ale tlak na miechu vyvolá poškodenie, ktoré sa rozšíri aj do okolia. Tým sa porušia základné motorické reflexy, ktoré zabezpečujú stálu adaptáciu dĺžky svalu na pohyb, ďalej polysynaptické reflexy, ktoré ukončujú kontrakcie vyvolané napínacím reflexom a exteroceptívne reflexy, ktoré vznikajú dráždením receptorov uložených predovšetkým v koži. Tieto reflexy budú po traumatickom poškodení miechy zachované iba čiastočne. Zvieratá, ktoré sú po chirurgickom zákroku sa dokážu premiestňovať pomocou predných končatín, zadné končatiny vykazujú neurologické skóre = 0. V priebehu dvoch týždňov dochádza u zvierat k spontánnej obnove funkcie zadných končatín (zvieratá dosahujú neurologické skóre = 7 až 8). Neurologický stav experimentálnych zvierat sa počas ďalšieho prežívania nezlepšuje. Dôsledkom traumatického poškodenia miechy na úrovni Th9 je okrem paraplégie zadných končatín aj dočasná strata funkcie (čiastočná, alebo úplná) vyprázdňovania močového mechúra, preto sa zvieratú močový mechúr vyprázdňuje mechanicky palpačne prvé dni po Th9 kompresii 3-4 krát denne a v ďalšom období min. 2x denne, po dobu obnovenia funkcie (približne 2 týždne), vykonáva a posudzuje operatér.

Zvieratá bývajú po zákrokoch (C5 a Th9 kompresia) apatické. Prvé 2-3 dni po zákroku dostáva každé zviera fyziologický roztok (1-2ml; s.c.), aby sa predišlo dehydratácií, keďže zviera môže mať problém so zdvíhaním hlavy ku napájadlu. Takisto má dostupnú potravu priamo v kletke. Ak by jedince po operácii neprijímali krmivo, bude im podávaný fyziologický roztok s glukózou (i.p.) dovtedy, kým budú schopné tejto činnosti samostatne. Ukončenie podávania fyziologického roztoku/fyziologického roztoku s glukózou určuje operatér na základe pohybových schopností zvierat. Za účelom zníženia bolesti a zápalovej reakcie sa experimentálnym zvieratám tesne po kompresii miechy, keď je zviera ešte pod vplyvom anestézie, podajú analgetiká (Novasul, Richterpharma, 2ml/kg, i.m.) a antibiotiká (Amoksiklav, 30mg/kg, i.m.). Analgetiká a antibiotiká sa štandardne podávajú raz denne po dobu 3 dní po zákroku. Ak napriek intenzívnej pooperačnej starostlivosti bude zviera okrem symptómov ktoré sú typické pre pooperačný stav po C5 a Th9 kompresii (viď. vyššie) vykazovať apatiu, nechúť k jedlu, nebude čulé a bude javiť známky bolesti a celkovej nepohody, bude k nemu privolaný zmluvný veterinárny lekár. Po dohode operátora s veterinárnym lekárom bude zviera humánne usmrtené.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Priradenie krutosti k jednotlivým postupom:

Postup	Predpokladaná krutosť	Skutočná krutosť
Dorzálna laminektómia	stredná	stredná
Kompresia miechy (C5; Th9)	krutá	krutá
Subpiálna aplikácia	stredná	stredná

Dočasné individuálne umiestnenie zvierat po kompresii miechy (C5; Th9) (1 týždeň) a tiež po subpiálnej aplikácii Chondroitinázy ABC (1 týždeň)	slabá	slabá
Monitorovacie obdobie	slabá	slabá
Odber biologického materiálu	slabá	slabá

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

1. Nahradenie zvierat:

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

Existujúce alternatívne metódy nemôžu poskytnúť komplexnú odpoveď, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov. Počet zvierat použitých v kontrolnej a experimentálnej skupine je obmedzený na možné minimum. Zvieratá budú počas chirurgických zákrokov uspaté Isofluranom. Odber na biochemické analýzy sa vykoná v hlbokej chloralhydrátovej anestéze, na histochemické analýzy výlučne po eutanázii zvieraťa; odoberie sa predĺžená miecha a segmenty cervikálnej a torakálnej miechy.

2. Redukcia počtu zvierat:

(Zdôvodnenie použitia určeného počtu zvierat, akým spôsobom sa použije redukcia, objasnenie toho, že sa použil minimálny možný počet zvierat)

Počet experimentálnych zvierat (8 zvierat v skupine, celkovo 120 ks) bol stanovený vzhľadom na (1) predpokladanú individuálnu variabilitu výsledkov, z ktorých sa získava štatistická významnosť; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia miechy a určenie protektívneho vplyvu; (3) traumou poškodená miecha nemôže byť použitá zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy; (4) riziko čiastočného úhynu zvierat počas dlhodobého prežívania.

3. Zjemnenie:

Jednostranná kompresia C5 segmentu miechy silou 40 g/1 min spôsobí na strane lézie spasticitu prednej končatiny a čiastočnú paraplégiu zadnej končatiny so zachovanými miechovými reflexmi. V priebehu 4-5 dní dôjde k úplnej funkčnej obnove zadnej končatiny. Zvieratá, ktoré sú po chirurgickom zákroku dokážu prijímať potravu pomocou zdravej prednej končatiny a dokážu sa premiestňovať. Ak spasticita prednej končatiny bude výrazná a zviera bude prejavovať známky bolesti, zvieraťu bude počas prežívania tlmená bolesť analgetikom (Novasul, 2ml/kg, i.m.). Dĺžka podávania analgetika bude stanovená podľa odpovede zvieraťa na dotyk (posudzuje operatér).

Kompresia na úrovni Th9 segmentu silou 40 g/15 min spôsobí trvalú paraplégiu zadných končatín s čiastočne zachovanými miechovými reflexmi. Zvieratá, ktoré sú po chirurgickom zákroku sa dokážu premiestňovať pomocou predných končatín. Dôsledkom traumatického poškodenia miechy na úrovni Th9 je okrem paraplégie zadných končatín aj dočasná strata funkcie (čiastočná, alebo úplná) vyprázdňovania močového mechúra, preto sa zvieraťu po zásahu močový mechúr vyprázdňuje mechanicky palpačne 3-4 krát denne, a od 3-4 dňa sa vykonáva minimálne 2x denne až po dobu obnovenia funkcie (1-2 týždne); vykonáva a posudzuje operatér.

Chondroitináza ABC bude aplikovaná zvieratám subpiálne až 5. a 6. týždeň po kompresii (C5, Th9). Očakávame, že nepriaznivé účinky tohto chirurgického zákroku budú slabé a krátkodobé, a budú spojené hlavne s procesom hojenia rany. Subpiálna aplikácia katétra a podanie Chondroitinázy ABC nespôsobí zvieratám zhoršenie neurologických funkcií, spasticitu, poruchy vo vyprázdňovaní močového mechúra a ani žiadne iné nežiaduce stavy.

Kompresia miechy (C5 alebo Th9) a subpiálna aplikácia Chondroitinázy ABC budú vykonávané v celkovej inhalačnej anestézii izofluránom, t.j. nebudú pre zvieratá bolestivé. V pooperačnom období budú zvieratá pozorované. Na zmiernenie bolesti sa prvé tri dni po týchto chirurgických zákrokoch zvieratám podajú analgetiká (Novasul, 2ml/kg, i.m.) a antibiotiká (Amoksiklav, 30mg/kg, i.m.), aby sa predišlo prípadnej bolesti a zápalovej reakcii. Za účelom rehydratácie sa zvieratám počas prvých troch dní podá subkutánne fyziologický roztok (1-2ml). Prvé 2-3 dni po zákroku má zviera dostupnú potravu priamo v kletke. Ak by jedince po operácii neprijímali krmivo, bude im podávaný fyziologický roztok s glukózou (i.p.) dovtedy, kým budú schopné tejto činnosti samostatne. Ukončenie podávania fyziologického roztoku/glukózy určuje operatér na základe pohybových schopností zvierat. Ak napriek intenzívnej pooperačnej starostlivosti bude zviera okrem symptómov ktoré sú typické pre pooperačný stav po C5 a Th9 kompresii (vid'. vyššie) vykazovať apatiu, nechúť k jedlu, nebude čulé a bude javiť známky bolesti a celkovej nepohody, bude k nemu privolaný zmluvný veterinárny lekár. Po dohode operátora s veterinárnym lekárom bude zviera humánne usmrtené.

Každodenná starostlivosť experimentálnych zvierat sa člení medzi vysokoškolsky vzdelaných riešiteľov projektu, ktorí majú prax s experimentami na zvieratách, sú skúsení a vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Experimentálne zvieratá budú po zásahu označené na chvoste a následne budú umiestnené individuálne v kletkách s uvedením čísla zvierat. V kletke bude stály prístup potravy a pitnej vody. Po zahojení rany (cca 1 týždeň) budú zvieratá držané v skupinách (max. 3 zvieratá v malej kletke a max. 5 zvierat vo veľkej kletke), ktoré umožňujú prirodzené sociálne správanie. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu (rozhoduje zmluvný veterinárny lekár/operatér). Prostredie v kletkách je obohatené o drevené a kartonové domčeky. Nakoľko nepracujeme s infekčnými ani toxickým materiálmi, zvieratá budú štandardne umiestnené v pooperačnom oddelení zvieratníka.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Správne posúdenie: do 30.3.2021