

A

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu:

MODULÁCIA RESPIRAČNÝCH MOTORICKÝCH VÝSTUPOV KAŠĽA V EXPERIMENTE A PC SIMULÁCIÁCH

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 802/19-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

Neuromodulácia, reflex, kašeľ, mikroinjikovanie, počítačové modelovanie

Účel projektu*: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Ciele :

- 1) Preštudovať vplyv lokálnych zmien (spôsobených napr. mikroinjikovaním centrálnych antitusík alebo agonistov a antagonistov neurotransmiterov do oblastí mozgového kmeňa) v neurónových sieťach generujúcich dychový vzor a reflexné odpovede z respiračného systému.
- 2) Preskúmať vplyv periférnej modulácie primárne redukovaním vedenia vzruchu (napr. chladením n. vagus) na respiračné deje so zameraním na motorické a reflexné deje respiračného systému (eupnea, kašeľ, prehĺtanie).
- 3) Experimenty prevedené na anestézovanom zvieracom modeli simulovať na počítačovom modeli neurónovej respiračnej siete a následne na základe porovnania výsledkov z oboch typov experimentov počítačový model modifikovať s cieľom dosiahnuť čo najväčšiu zhodu pozorovaných parametrov.

Prínos z vykonaného projektu:

Vykonajú sa originálne postupy, ktoré prinesú dôležité poznatky o regulácii obranných mechanizmov respiračného traktu na úrovni mozgového kmeňa, najmä keď sú tieto mechanizmy zvýšené či nedostatočné. Preskúmajú sa taktiež efekty aplikácie neuroaktívnych látok, predovšetkým antitusík a overí sa možnosť štúdia sledovaných dejov na decerebrovanom modeli pri rozličnej modalite stimulov, ktorá sa nedá vykonať v anestéze. Výsledky budú základom pre klinické štúdie na zlepšenie „manažmentu“ respiračnej obrany u pacientov.

Predpokladané prínosy :

Nové poznatky o regulácii pokojného dýchania, kašľa, prehĺtania atď. najmä v cieľových oblastiach mozgového kmeňa.

Objasnenie účinku a mechanizmov niektorých neuromodulátorov.

Zistenie rozdielov v mechanizmoch obrany respiračného traktu iniciovaných rozličnými typmi stimulov.

Model pre výskum kašľa a ďalších reflexov vyvolaných stimuláciou receptorov C vlákien.

Predikcia vplyvu zásahov do centrálnych oblastí zodpovedných za tvorbu dychového vzoru a reflexných odpovedí z dýchacích ciest.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Králik domáci – 14 jedincov

Mačka domáca – 16 jedincov

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

Postupy s anestézovanými zvieratami sú terminálne v náležitej úrovni anestézie s uplatnením všetkých postupov na správne monitorovanie jedinca (vitálne funkcie, v prípade potreby respiračná podpora, normotermia, lokálne anestetiká atď.) a prevenciu akéhokoľvek vnímania bolesti a diskomfortu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Anestézované jedince – bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Komplexné neurónové funkcie a odpovede organizmu sa dajú v súčasnosti študovať len na živom jedincovi alebo obmedzene s použitím modelových a simulačných techník. Aj počítačové modelovanie však závisí od experimentálnych údajov. V našom projekte sa sústredíme na experimentálne techniky s experimentálnymi zvieratami. Pre komplexné reflexné odpovede z respiračného traktu (prakticky je zapojený celý organizmus) nie sú metódy práce s izolovaným orgánom, tkanivom, či jednotlivou bunkou bez zahrnutia takmer celého jedinca aplikovateľné.

Mačka domáca a králik domáci sú vhodné laboratórne zvieratá, ktoré sa využívajú v experimentálnych štúdiách obranných reflexov dýchacích ciest. Predovšetkým behaviorálne a centrálné mechanizmy týchto dejov ako aj antitusické účinky sú najlepšie preskúmané u týchto druhov a tieto aj predstavujú najlepšiu variantu pre transláciu výsledkov na človeka. Veľkosť mačky a králika umožňuje také experimentálne postupy, ktoré nie je možné spoľahlivo v našich podmienkach vykonávať u morčiat. Neexistujú alternatívne druhy (s čiastočnou výnimkou morčat'a), pretože nižšie druhy laboratórnych zvierat (myš, potkan) nemajú vyvinutý kašľový reflex, vyvolanie ďalších odpovedí a manipulácia so zvieratami je limitovaná ich stabilitou, odolnosťou a veľkosťou.

2. Redukcia počtu zvierat:

Na splnenie našich početných cieľov predpokladáme vykonať počas 2 rokov asi 30 protokolov v 4 sériách. Jednotlivé postupy budú vykonané na najnižšom počte jedincov

tak, aby bol výsledok postupu štatisticky hodnotiteľný a dáta získané z postupu relevantné. Mnohoročný experimentálny výskum potvrdzuje nutnosť zahrnúť do jednej série 6 až 8 jedincov v závislosti od druhu zvieratá, typu experimentu a variability získaných dát. Efektívnosť využitia jedinca je znížená nutnosťou vykonať aj kontrolné testy a tým, že je postup u anestézovaného a decerebrovaného jedinca terminálny. Zvýšenie efektívnosti a minimalizovanie počtu jedincov bude dosiahnuté: 1) vykonaním niekoľkých protokolov na tom istom jedincovi (ak je to vedecky aplikovateľné) ak je to uskutočniteľné (najmä u mačky), 2) priebežným hodnotením výsledkov so sledovaním úrovne štatistickej významnosti sledovaných parametrov, 3) použitím počítačových simulácií predikujúcich výsledky v experimentoch, 4) využitím skúseností, postupov a dát (najmä kontrolných) z predchádzajúcich postupov,

3. Zjemnenie:

Mačka je druh mnoho desaťročí využívaný v neurologickom výskume, odolný, dobre monitorovateľný. Je dostupné značné množstvo dát o neurónových funkciách pri dýchaní, adaptačných respiračných odpovediach, ale aj pri kašli, kýchaní, prehĺtaní atď. Všetky predpokladané skúmané deje sú u mačky vyvolateľné a dobre opísané.

Králik je druh v porovnaní s mačkou menej odolný a ťažšie monitorovateľný. Taktiež je dostupné množstvo dát potrebných pre predmet nášho výskumu, najmä o neurónových funkciách pri dýchaní a kašli. Všetky skúmané deje sú vyvolateľné, najmä reflex kýchania. Existujú rozdiely v centrálnej regulácii voči mačke.

Stres jedincov sa minimalizuje ich sedáciou a anestézovaním priamo vo zverinci (bez podnetov súvisiacich s manipuláciou a prepravou). Pred podaním anestetika sa zvieratá premedikujú podaním diazepamu, rovnako ako pacienti pred operáciou, čo zabezpečí hladší priebeh úvodu do anestézie a minimalizuje sa stres, ku ktorému by mohlo dochádzať počas podávania anestetika intraperitoneálne. Uplatňujú sa všetky postupy na optimálny monitoring funkcií a parametrov jedinca. Po ukončení tejto časti postupu sú zvieratá humánne usmrtené predávkovaním anestetika.

Humane endpoints:

Humane endpoints nastane v prípade súčasnej prítomnosti viac ako 5 prejavov zhoršeného zdravotného stavu t.j. malátnosti, dehydratácie, neschopnosťou natiahnúť sa za vodou a potravou, stratou hmotnosti $\geq 20\%$, agonálnym dýchaním (gaspings), výrazným poklesom krvného tlaku.

Hodnotiace skóre zdravotného stavu zvierat

Bodové skóre	Charakter zdravotného stavu	Opatrenie
0	Fyziologický zdravotný stav	
1	Dobrý zdravotný stav	
2	Mierne zhoršený zdravotný stav	Zváženie doplnkovej starostlivosti, častejšia kontrola zvieratá

3	Zhoršený zdravotný stav	Prítomnosť 3 prejavov zhoršeného zdravotného stavu. Častejšia kontrola zvieraťa, doplnková starostlivosť (analgetiká, pridanie tekutín, zvýšenie tepla)
4	Zlý zdravotný stav	Prítomnosť 4 prejavov zhoršeného zdravotného stavu. Porada s veterinárom.
5	Nepriaznivý zdravotný stav	Prítomnosť 5 a viac prejavov zhoršeného zdravotného stavu (humane endpoint). Vyradenie zvieraťa z postupu.

Sledované parametre v hodnotiacom procese:

- celkový vzhľad zvieraťa:
 - o telesný stav (prírastok / úbytok hmotnosti)
 - o stav srsti / kože (čistenie, pilorekcia, kožné lézie, hydratácia kože)
 - o prítomnosť výtoku (oči, uši, nos, urogenitálny systém)
 - o vzhľad očí (zatvorené, polozatvorené, zakalenie)
 - o spôsob pohybu a stav pohybového aparátu (pokrývkávanie, nakláňanie, krúženie, stereotypné držanie tela)
- telesné funkcie zvieraťa:
 - o príjem potravy a vody
 - o respiračný systém (zrýchlené, ťažké, lapavé dýchanie a iné zvuky)
 - o vyprázdňovanie a močenie
- sociálne interakcie zvieraťa:
 - o hypo/heperaktivita, bojazlivé / agresívne interakcie, zreteľné únikové reakcie, skrývanie sa
- chovné prostredie
 - o znečistenie podstielky, stolica a jej hustota, prítomnosť vývratkov, krvi
- voľné pozorovania:
 - o iné neobvyklé pozorovania, znaky bolesti a utrpenia – výraz tváre (nos, uši, fúzy)

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý je v kategórii „bez možnosti zotavenia“, podľa § 37 ods. 3 nariadenia vlády č. 377/2012 Z. z. projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

NÁZOV PROJEKTU:

Protektcia kardiovaskulárneho systému pri experimentálnej hypertenzii a zlyhaní srdca duálnou inhibíciou neprilyzínu a AT1 receptorov pre angiotenzín II: porovnanie s ACE-inhibíciou a melatonínom

ČÍSLO KONANIA ROZHODNUTIA O SCHVÁLENÍ PROJEKTU: 809/19-221/3

KLÚČOVÉ SLOVÁ: hypertenzia, zlyhanie srdca, ARNI, kaptopril, melatonín

ÚČEL PROJEKTU: základný výskum

CIEĽ PROJEKTU:

Projekt má za cieľ objasniť vplyv duálnej inhibície neprilyzínu a AT1 receptorov (ARNI) na adaptačný proces kardiovaskulárneho systému potkana pri chronickom tlakovom hemodynamickom preťažení následkom rôznych typov experimentálnej hypertenzie (SHR, L-NAME, kontinuálne osvetlenie, laktacystín) a srdcového zlyhávania (izoprenalín) a porovnať ho s už dokázanými antiremodelačne pôsobiace látkami (ACE-inhibítorom kaptoprilom a melatonínom). Zároveň sa vyšetrí vplyv hypertenzie, srdcového zlyhávania a ich farmakologického ovplyvnenia na prejavy správania zvierat.

PRÍNOS Z VYKONANÉHO PROJEKTU:

Prínosom projektu bude zistiť potenciálny komplexný efekt ARNI na hypertenzné srdce a alterované periférne orgány (aorta, a. femoralis, obličky, mozog) v sekvencii experimentov na rozličných modeloch experimentálnej hypertenzie (SHR, L-NAME, kontinuálne osvetlenie, laktacystín) a v experimente zameranom na redukcii mortality pri zlyhaní srdca indukovanom izoprenalínom. Potenciálny dôkaz protektívneho efektu ARNI pri hypertenznom srdci by mohol prispieť nielen k objasneniu mechanizmov jeho protektívneho účinku, ale aj k rozšíreniu indikácií využitia jeho terapeutického potenciálu pri liečbe hypertenzie a hypertrofie ľavej komory a periférnych orgánov v iniciálnych štádiách ich poškodenia.

DRUHY POUŽITÝCH ZVIERAT A ICH PREDBEŽNÉ POČTY:

Wistar potkany, samce	385
SHR potkany, samce	60
Spolu potkany, samce	445

PREDPOKLADANÝ NEPRIAZNIVÝ VPLYV / UJMA NA POUŽITÉ ZVIERATÁ V RÁMCI VYKONÁVANIA PROJEKTU:

Zvieratá budú po presunutí z chovného zariadenia v karanténe po dobu 2 týždňov. Počas tohto obdobia si zvieratá budú zvykať na manipuláciu osobami, ktoré budú s nimi pracovať v priebehu celého projektu. Zároveň budú nacvičované na váženie a neinvazívne meranie tlaku krvi a frekvencie srdca. Na tieto úkony sa zvieratá rýchlo adaptujú a nespôsobujú u nich zmenu behaviorálnych prejavov. Chované budú za štandardných podmienok: teplota vzduchu 20-24°C, relatívna vlhkosť vzduchu 45-65%, svetelný režim 12/12 hod (s výnimkou potkanov s experimentálnou hypertenziou navodenou 24 hodinovým osvetlením), potrava KKZ-P-/M *ad libitum*, pitná voda *ad libitum*, vhodná podstielka sa kupuje a skladuje v originálnom balení, suchá, neprašná so zaručenou kvalitou, výmena podstielky 2x/týždeň, resp. podľa potreby. Umiestnené budú vo vaniciach po 2 potkanoch, aby mohli sociálne interagovať a komunikovať.

U spontánne hypertenzných potkanov (SHR) je hypertenzia geneticky determinovaná a vyvíja sa okolo 4. – 6. týždňa života SHR. Model hypertenzie indukovanej kontinuálnym osvetlením vzniká na základe 24 hodinového osvetlenia potkanov s redukcii vylučovania melatonínu z epifyzy vplyvom svetla, čím sa redukuje antihypertenzívne pôsobenie tohto hormónu. Svetlo pôsobí na potkanov v prievitných vaniciach s intenzitou 500 luxov po dobu 6 týždňov, pričom k vzniku hypertenzie dochádza postupne, bez akútneho poškodenia kardiovaskulárneho systému. N-G-nitro-L-arginín metyl ester (L-NAME) navodzuje postupnú hypertenziu inhibíciou enzýmu NO-syntázy s následným deficitom produkcie oxidu dusnatého a redukciiu jeho prirodzených ochranných účinkov na kardiovaskulárny systém. Laktacystín je nešpecifický inhibitor proteáz, ktorý interferuje so syntézou a degradáciou viacerých proteínov zúčastňujúcich sa remodelácie kardiovaskulárneho systému, ako napríklad

nukleárny faktor kappa B, tyrozinhydroxyláza alebo cyklooxygenáza-2 a podieľa sa na rozvoji hypertenzie s fibrotickou prestavbou srdca. Vo všeobecnosti, hypertenzné potkany netrpia následkom vzniku hypertenzie (podobne ako ľudská hypertenzná populácia), preto sa v humánnej medicíne hypertenzia nazýva „tichý zabijak“. Postupná remodelácia orgánov a endotelová dysfunkcia nie sú spojené s utrpením zvierat, ale štrukturálne a funkčné zmeny navodené hypertenziou sú tzv. surrogate (náhradným) endpointom (čiže nie poškodením, ale markerom, ktorý poškodeniu orgánov s ich následnou dysfunkciou predchádza).

Zlyhávanie srdca u potkanov budeme indukovať intraperitoneálnou aplikáciou izoprenalínu. Izoprenalín je agonista beta-receptorov a spôsobuje poškodenie myokardu s hypertrofiou srdca, dysfunkciou ľavej komory až nakoniec zlyhanie srdca. Tieto zvieratá zhoršene tolerujú námahu, môžu byť dušné, mať dysrytmie a zriedkavo podľahnúť úmrtiu (väčšinou ako následok fatálnej dysrytmie), čo by sa mohlo klasifikovať ako mierny až stredný stupeň krutosti.

V skupinách s navodenou hypertenziou alebo zlyhávaním srdca, ktorým budeme podávať ARNI, kaptopril alebo melatonín, sa očakáva ich protektívny účinok.

Na minimalizáciu stresu budú osoby v projekte zaobchádzať s potkanmi ohľaduplne a šetrne a potkany budú mať vo svojej vanici k dispozícii predmety na hru a obhryzovanie. Na minimalizáciu bolesti zvierat pri injekčnej aplikácii látok budeme používať tenké sterilné ihly. Aplikáciu látok a anestetik bude vykonávať vždy osoba, na ktorú sú zvieratá zvyknuté pri manipulácii. Počas chronickej intraperitoneálnej aplikácie látok budeme pravidelne sledovať, či nedochádza k zápalovej reakcii v miestach vpichu injekcie. V prípade zápalu budeme stav konzultovať s veterinárnym lekárom a na jeho prípadné odporúčenie použijeme liečbu antibiotikami. Jednotlivé postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo utrpenie, strach a bolesť zvierat a sú klasifikované ako slabá až stredná krutosť.

Počas projektu budeme monitorovať zdravotný stav a pohodu zvierat a pozorovania zaznamenávať do hárkov. Vypracujeme bodové skóre, na základe ktorého budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom liečené a ďalej použité v projekte alebo budú z projektu vyradené a humane usmrtené hlbokou anestéziou tiopentalom v dávke 45 mg/kg intraperitoneálne (humane endpoint), viď nižšie. Pri predčasnom úmrtí experimentálneho zvieratá veterinárny lekár vykoná pitvu a prípadné ďalšie potrebné vyšetrenia a určí príčinu úmrtia.

Vplyv úkonov v projekte na zvieratá:

Charakteristika úkonu	Vplyv na zviera	Kategória krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvieratami. Bolesť žiadna. Trvanie 1 min.	Slabá
Chronická expozícia zvierat 24h osvetleniu	Narušenie cirkadiálneho rytmu zvieratá. Postupný rozvoj hypertenzie. Bolesť žiadna.	Stredná
Chronická perorálna aplikácia látok	Látky rozpustené v pitnej vode vo fľaši. Bolesť žiadna.	Stredná
Chronická intraperitoneálna aplikácia látok	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.	Stredná
Rozvoj hypertenzie	Postupná remodelácia orgánov a endotelová dysfunkcia.	Stredná
Rozvoj zlyhávania srdca	Zhoršená tolerancia námahy, zvieratá môžu byť dušné, mať dysrytmie a zriedkavo podľahnúť úmrtiu (väčšinou ako následok fatálnej dysrytmie).	Stredná
Opakované neinvazívne meranie systolického tlaku krvi a frekvencie srdca	Krátkodobé obmedzenie pohybu a nahriatie na 38 – 39°C počas cca. 6 min. Bolesť žiadna. Trvanie 30 sekúnd.	Slabá
Echokardiografické vyšetrenie	Bolesť žiadna. 15 min. v izoflurínovej anestézii.	Slabá
Test otvoreného poľa	Bolesť žiadna. Trvanie 5 min.	Slabá
Vyvýšené križové bludisko	Bolesť žiadna. Trvanie 5 min.	Slabá
Test preferencie svetla/tmy	Bolesť žiadna. Trvanie 5 min.	Slabá
Test rozpoznávania nového objektu	Bolesť žiadna. Trvanie 5 + 5 min.	Slabá

Test vynúteného plávania	Krátkodobý stredný stres spôsobený vynúteným plávaním. Trvanie 5 min.	Stredná
--------------------------	---	---------

PREDPOKLADANÁ ÚROVEŇ KRUTOSTI:

Slabá: váženie, manipulácia so zvieratami, opakované neinvazívne meranie systolického tlaku krvi a frekvencie srdca, echokardiografické vyšetrenie, test otvoreného poľa, vyvýšené krížové bludisko, test preferencie svetla/tmy, test rozpoznávania nového objektu

Stredná: chronická expozícia zvierat 24h osvetleniu, chronická perorálna aplikácia látok, chronická intraperitoneálna aplikácia látok, rozvoj hypertenzie, rozvoj zlyhávania srdca, test vynúteného plávania

POUŽÍVANIE METÓD NA ÚČELY NAHRADENIA, OBMEDZENIA A ZJEMNENIA POUŽÍVANIA ZVIERAT V POSTUPOCH:

Pri práci so zvieratami budú dodržané všetky predpísané predpisy pre chov a zaobchádzanie s laboratórnymi zvieratami podľa zásad 3 R.

REPLACEMENT: Pretože v plánovaných experimentoch sa bude hodnotiť správanie zvierat, alterácia funkcie a štruktúry orgánov a následky terapeutických intervencií, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonával „*in vivo*“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádzajú pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu.

REDUCTION: V projekte bude použitý minimálny možný počet experimentálnych zvierat, ktorý je potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím ANOVA testu a Studentovho t-testu pre analýzy zamerané na vyhodnotenie vhodnosti zvolenej terapie a sledovania rozdielov v jednotlivých skupinách zvierat vo vzťahu k zvolenej liečbe. V projekte bude použitý minimálny počet kontrolných zvierat. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe projekt opakovať. V projekte sa použijú geneticky homogénne skupiny zvierat. Cieľom 4. etapy projektu je sledovanie prežívania zvierat so zlyhávaním srdca indukovaného izoprenalínom. Keďže z našich predošlých projektov, ako aj z publikovaných údajov s izoprenalínom bola zaznamenaná úmrtnosť zvierat počas trvania projektu (cca. 30%), je potrebné navýšiť počet zvierat, aby bola dosiahnutá štatistická významnosť aj v prípade možných úmrtí zvierat (bez toho, by došlo k znehodnoteniu projektu). Pri podávaní ARNI zvieratám so zlyhávaním srdca predpokladáme redukcii morbiditu aj mortality.

REFINEMENT: Zvieratá budú po presunutí z chovného zariadenia v karanténe po dobu 2 týždňov, pričom budú dodržané štandardné podmienky. Počas tohto obdobia si zvieratá budú zvykať na manipuláciu osobami, ktoré budú s nimi pracovať v priebehu celého projektu. Zároveň budú nacvičované na váženie a neinvazívne meranie tlaku krvi a frekvencie srdca. Na tieto úkony sa zvieratá rýchlo adaptujú a nespôsobujú u nich zmenu behaviorálnych prejavov. Chované budú za štandardných podmienok: teplota vzduchu 20-24°C, relatívna vlhkosť vzduchu 45-65%, svetelný režim 12/12 hod (s výnimkou potkanov s experimentálnou hypertenziou navodenou 24 hodinovým osvetlením), potrava KKZ-P-IM *ad libitum*, pitná voda *ad libitum*, vhodná podstielka sa kupuje a skladuje v originálnom balení, suchá, neprašná so zaručenou kvalitou, výmena podstielky 2x/týždeň, resp. podľa potreby. Umiestnené budú vo vaniciach po 2 potkanoch, aby mohli sociálne interagovať a komunikovať. Na minimalizáciu stresu budú osoby v projekte zaobchádzať s potkanmi ohľaduplne a šetrne a potkany budú mať vo svojej vanici k dispozícii predmety na hru a obhryzovanie. Na minimalizáciu bolesti zvierat pri injekčnej aplikácii látok používame tenké sterilné ihly. Aplikáciu látok a anestetik vykonáva vždy osoba, na ktorú sú zvieratá zvyknuté pri manipulácii. Počas chronickej intraperitoneálnej aplikácie látok sa bude pravidelne sledovať, či nedochádza k zápalovej reakcii v miestach vpichu injekcie. V prípade zápalu budeme stav konzultovať s veterinárnym lekárom a na jeho prípadné odporúčenie použijeme liečbu antibiotikami. Jednotlivé postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo utrpenie, strach a bolesť zvierat a sú klasifikované ako slabá až stredná krutosť.

Humane endpoint:

Počas projektu budeme monitorovať zdravotný stav a pohodu zvierat a pozorovania zaznamenávať do hárkov. Vypracujeme bodové skóre, na základe ktorého budú zvieratá po konzultácii s veterinárnym lekárom liečené a ďalej použité v projekte alebo budú z projektu vyradené a humane usmrtené hlbokou anestéziou tiopentalom v dávke 45 mg/kg intraperitoneálne (humane endpoint). Pri predčasnom úmrtí experimentálneho zvieratá veterinárny lekár vykoná pitvu a prípadné ďalšie potrebné vyšetrenia a určí príčinu úmrtia.

Sledované parametre v hodnotiacom procese:

PARAMETER	PREJAV ZHORŠENÉHO ZDRAVOTNÉHO STAVU
Celkový vzhľad zvierat'a	- telesný stav (prírastok / úbytok hmotnosti > 20 %) - stav srsti/kože (nečistenie sa, piloerekcia, strata ochlpenia, kožné lézie, dehydratácia kože) - prítomnosť výtoku (oči, uši, nos, urogenitálny systém) - vzhľad očí (vpadnuté, zatvorené, polozatvorené, zakalenie) - prítomnosť slinenia a anomálie zhryzu, prerastené zuby
Telesné funkcie zvierat'a	- príjem potravy a vody (zvýšený, znížený) - dýchanie (zrýchlené, ťažké dýchanie, sipenie a iné zvuky) - telesná teplota (zvýšená, znížená, sfarbenie končatín) - stolica a močenie
Chovné prostredie	- znečistenie podstielky, stolica a jej hustota, prítomnosť vývratkov, krvi, používanie pomôcok na obohatenie prostredia
Správanie	- sociálne interakcie zvierat'a (hypo/hyperaktivita, bojazlivé, agresívne interakcie, zreteľné únikové reakcie, skrývanie sa) - nežiadúce správanie (stereotypné správanie, „holenie“ srsti a fúzov, trichotillomania, zvýšená agresivita voči ľuďom) - držanie tela a pohyblivosť (abnormálne držanie tela, chôdza, krívanie, neprítomnosť pohybu, nekoordinované pohyby, skrčené brucho, naklonená hlava, tras, záchvaty, krčče) - vokalizácia
Vol'né pozorovania	- iné neobvyklé pozorovania, znaky bolesti a utrpenia – výraz tváre (nos, uši, fúzy), sťahovanie brucha, nafúknuté brucho

Hodnotiace skóre zdravotného stavu zvierat:

Počet prejavov zhoršeného zdravotného stavu	Charakter zdravotného stavu	Opatrenie
0	Fyziologický zdravotný stav	
1	Dobrý zdravotný stav	
2	Mierne zhoršený zdravotný stav	Častejšia kontrola zvierat'a, zváženie doplnkovej starostlivosti
3	Zhoršený zdravotný stav	Častejšia kontrola zvierat'a, doplnková starostlivosť (analgetiká, pridanie tekutín, zvýšenie tepla)
4	Zlý zdravotný stav	Konzultácia s veterinárnym lekárom
5 a viac	Nepriaznivý zdravotný stav	Vyradenie zvierat'a z projektu (humane endpoint): humánne usmrtenie pod dohľadom veterinárneho lekára

PROJEKT BUDE PODLIEHAŤ OPÄTOVNÉMU SCHVAĽOVANIU: nie

933/19-221/3

Názov projektu: Zmrazovanie potkaních embryí

Kľúčové slová v projekte: Alzheimerova choroba, embryotransfer, udržiavanie transgénnych línií, kryozmrazovanie

Účel projektu: Základný výskum

Podrobný účel postupu:

Cieľom predkladaného projektu je vytvorenie banky embryí ako zdroja udržateľnosti transgénnych línií. Projekt sa bude vykonávať vo viacerých na seba nadväzujúcich fázach. Prvá fáza projektu bude spočívať v získavaní embryí a ich následnom zmrazovaní. Embryá sa budú izolovať v štádiu blastocysty (4.5 deň vývoja) výplachom maternicových rohov. Na tento účel bude použitých spolu 500 donorských samíc. Získané blastocysty budú zmrazované metódou vitrifikácie a uchovávané v tekutom dusíku LN2 pre budúce použitie. Tieto sa na 4.5 deň post coitum (od pripustenia so samcami) humánne usmrtia cervikálnou dislokáciou. Po otvorení brušnej dutiny sa postupne izolujú a vyplachujú maternicové rohy v médiu pre to určenom. Získané embryá sa zmrazia a uchovávajú v tekutom dusíku. V prípade potreby budú rozmrazené a následne použité na prenos do pseudogavidných samíc.

V druhej fáze projektu sa zameriame na in vitro a in vivo hodnotenie viability embryí. V rôznych časových úsekoch budeme embryá rozmrazovať a hodnotiť mikroskopicky percento prežiteľnosti (in vitro hodnotenie). Životaschopné embryá sa budú následne implantovať do príjemkýň a na základe percentuálnej úspešnosti ich zabrezávania sa zhodnotí in vivo viabilita embryí. Pre účely implantácie si v prvom kroku pripravíme sterilných samcov kastrovaných v celkovej anestézii podviazaním semenovodov. Tie sa začnú využívať až 3 týždne po operácii.

V pokuse sa použije 50 príjemkýň. Pohlavne dospelé samice sa budú pripúšťať so sterilnými samcami na dosiahnutie pseudogavidity a použijú na príjem revitalizovaných embryí. Prenos embryí sa vykoná v celkovej anestézii implantáciou do rohu maternice. Zvieratám sa poskytne pooperačná starostlivosť formou aplikácie analgetík.

Kryozmrazovanie sa bude vykonávať len po dobu získania a uchovania dostatočného množstva viabilných embryí schopných vývoja v životaschopné potomstvo.

Narodeným mláďatám sa odoberú vzorky na genotypizáciu pre určenie transgénnych zvierat. Po ich odstave sa matky humánne usmrtia.

V priebehu pokusu bude všetkým zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť.

V prípade ochorenia budú zvieratá po dohode s veterinárnym lekárom z pokusu vylúčené a humánne usmrtené. Zvieratám sa nesmie v priebehu pokusu spôsobovať zbytočná bolesť, stres a utrpenie. Všetky bolestivé zákroky sa vykonávajú v celkovej anestézii. Zvieratá musia byť na začiatku každého experimentu aklimatizované na nové podmienky.

Projekt prebehne v niekoľkých čiastkových experimentoch:

1. Fáza projektu: získavanie a zmrazovanie embryí:

• **Izolácia embryí z maternicových rohov darkýň – transgénne línie**

- počet použitých zvierat: -150 samíc (darkýň) SHR 72
- 200 samíc (darkýň) SHR 24
- 150 samíc (darkýň) W 72

Samice sa na 4,5 deň od pripustenia humánne usmrtia. Po otvorení brušnej dutiny sa postupne izolujú a vyplachujú rohy maternice v médiu pre to určenom. Získané embryá sú zmrazované a dlhodobo uchovávané v tekutom dusíku. V prípade potreby sú revitalizované a následne prenesené do reprodukčného traktu recipientiek.

2. Fáza projektu: in vitro a in vivo hodnotenie viability embryí

• Príprava sterilných samcov

- počet použitých zvierat: 18 samcov z kmeňa Sprague Dawley
- počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 3
- počet zvierat v čiastkových pokusoch: 6 samcov

Samci vo veku 8 týždňov sa uvedú do celkovej anestézie. Cez drobný rez v stredovej línii brušnej dutiny sa postupne povytiahnu oba semenovody a následne podviažu. Po sutúre rany sa zviera ponechá v čistej kletke. V deň operácie a počas nasledujúcich dvoch dní sa zvieratám subkutánne podajú analgetiká (rimadyl). V prípade vážnych zdravotných komplikácií sa zviera z experimentu vylúči a humánne sa usmrtí. Uvedený počet samcov, je maximálny ktorý sa použije, dobre pripravený samci sú schopný opakovaného párenia (aj dlhšie obdobie- viac ako 1 rok), pokiaľ nebude nevyhnutné ďalších samcov pripravovať nebudeme.

• Prijemkyne embryí

- počet zvierat v celom pokuse: 50 samičiek príjemkýň z kmeňa Sprague Dawley
- počet opakujúcich sa čiastkových pokusov: 10
- počet zvierat v čiastkových pokusoch: 5 samičiek

Pseudogavidné samice sú na 3,5 deň po koite použité ako recipientky revitalizovaných embryí. Po uvedení do celkovej anestézie a po obnaužení materničného rohu, sú embryá implantované do reprodukčného traktu náhradnej matky. Po transfere je samica umiestnená do čistej kletky a sledovaná počas celého obdobia gravidity. V deň operácie a počas nasledujúcich dvoch dní sa zvieratám subkutánne podajú analgetiká (rimadyl). V prípade vážnych zdravotných komplikácií sa zviera vyradí z experimentu a humánne sa usmrtí. Matky sa po odstave humánne usmrtia.

• Odber vzoriek na genotypizáciu

Vo veku 5-7dní sa mláďatám odstrihne cca 0,3-0,5 mm tkaniva z chvosta, ktoré sa vloží do označenej skúmavky a ponechá v mrazničke až do doby, kým sa začne spracovávať. Používa sa lokálne anesteikum (mesocain gél), v prípade výraznejšieho krvácania, priložíme na ranu gázu s adrenalínom. Na základe výsledkov genotypizácie sa mláďatá rozdelia na pozitívne (majú integrovaný nový gén) a negatívne, z ktorých je väčšina z chovu vyradená.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Animálne modely majú nezastupiteľné postavenie vo výskume ľudských neurodegeneračných ochorení. Predstavujú zjednodušené modely neurodegeneratívnych zmien, ktoré nám pomáhajú pochopiť a objasniť patologické mechanizmy ochorenia. S nedávnym progresom v oblasti genetických technológií rastie počet animálnych modelov exponenciálnym radom, čím sa zvyšujú aj požiadavky na ich chov a ustajnenie. Produkcia transgénnych zvierat v takomto rozsahu nie je možná bez organizácie kryobáň embryí. Zmrazovanie línií v embryonálnom štádiu predstavuje ekonomickú a bezpečnú alternatívu ku chovným líniám a zároveň poskytuje ochranu zvierat pred mikrobiálnou kontamináciou a spontánnymi genetickými zmenami. Kryozmrazovanie je zdrojom trvalej udržateľnosti transgénnych línií a je tiež v súlade so zásadami 3R: zjemnenie, redukcia, nahradenie.

Embryo transfer predstavuje „zlatý štandard“ revitalizácii zmrazených línií a v kombinácii s rederivačným programom umožňuje produkciu tzv. SPF zvierat z kontaminovaných línií.

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

Druhy použitých zvierat a ich počty:

Na celé obdobie trvania projektu plánujeme použiť tieto potkanie línie:

Darkyne:150 samíc SHR 72, 200 samíc SHR 24 a 150 samíc W 72

Recipientky: 50 samíc SD

Samci: 18 SD

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

Všetky chirurgické metódy (implantácia embryí, vazektómia) budú vykonávané v celkovej anestézii, v rámci pooperačnej starostlivosti im budú podávané analgetiká (Rimadyl). Odber embryí sa uskutoční post mortem – až po usmrtení samíc. Mesocain gél bude aplikovaný lokálne, pri odbere tkaniva chvosta na genotypizáciu.

Všetky zvieratá v experimente sú pravidelne kontrolované, v prípade pretrvávajúcej bolesti, neadekvátnej reakcie zvierat, po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point.

Human end points:

Zdravotný stav každého zvieratá bude hodnotený na základe štyroch znakov:

- *letargie (lethargy),
- *hrbenia (hunching),
- *naježenej srsti (piloerection),
- *straty váhy >15 % očakávanej hmotnosti (weight loss).

Každý znak má hodnotu jedného bodu a výsledné skóre je súčtom jednotlivých pozorovaných príznakov, tzn. maximálne skóre sú štyri body. Každé zviera ohodnotené jedným bodom bude presunuté do kliečky s neobmedzeným prístupom ku krmivu a vode. Každé zviera ohodnotené dvoma bodmi bude presunuté do kliečky s neobmedzeným prístupom k vlhkej strave a vode. Každé zviera ohodnotené tromi alebo štyrmi bodmi bude humánne usmrtené.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Vaginálna laváž	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Trvanie 30 sekúnd.	slabá
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Trvanie 30 sekúnd.	slabá
Operačný zákrok v celkovej anestézii (embryotransfer) - príjemkyne embryí	Urobí sa otvor v brušnej dutine (1,5cm incízia) a embryá v štádiu blastocysty sa implantujú do rohu maternice. Pooperačná bolesť bude utlmená analgetikami (Rimadyl, s.c.).	stredná
Operačný zákrok v celkovej anestézii (vazektómia) - príprava sterilných samcov	Urobí sa drobný rez v stredovej línii dutiny brušnej, povytiahnu sa semenovody a následne podviažu. Pooperačná bolesť bude utlmená analgetikami (Rimadyl, s.c.).	stredná
Odber tkaniva za účelom genotypizácie- špička chvosta	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Odstrihnutie 0,3-0,5mm tkaniva chvosta v lokálnej anestézii (Mesocain gel).	stredná
Celková krutosť		stredná

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie: So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebudú zbytočne vystavované stresu. Pooperačná bolesť bude utlmená analegetikami. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociologickým potrebám, v chovných nádobách s obohateným prostredím. V týždni predpokladaného rodenia mláďat sa minimalizuje vstup do miestnosti ako aj manipulácia so samicami. Do chovných nádob sa samiciam pridáva materiál na tvorbu hniezd.

Redukcia: Kryozmrazovanie sa bude vykonávať len po dobu získania a uchovania dostatočného množstva viabilných embryí schopných vývoja v životaschopné potomstvo. Zmrazovanie embryí predstavuje ekonomickú a bezpečnú alternatívu ku chovným líniam, tzn. redukuje počet chovných zvierat potrebných pre udržanie línie.

Nahradenie: Tento typ pokusu vyžaduje použitie zvierat, nakoľko nie je možné ho realizovať v podmienkach in vitro a neexistuje žiadna alternatívna metóda, ktorá by ich použitie nevyžadovala.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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. Odber embryí sa bude vykonávať až po humánnom usmrtení zvierat cervikálnou dislokáciou. Ostatné zákroky sa budú vykonávať v hlbokéj anestézii a zvieratám bude poskytnutá pooperačná starostlivosť. Na zmiernenie bolesti im budú podané analgetiká (Rimadyl).

Po ukončení projektu budú všetky zvieratá humánne usmrtené nadmernou dávkou anestetika a cervikálnou dislokáciou. Po získaní dostatočného množstva viabilných embryí sa projekt ukončí.

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu.

Začiatok pokusu je plánovaný na 1.5.2019 a bude sa realizovať do 31.12.2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

933/19-221/3a

Názov projektu: Poškodenie mozgovno-cievnej bariéry v prostredí neurodegenerácie u transgénnych potkaních modelov pre tauopatie

Kľúčové slová: mozgovno-cievna bariéra, animálny model, Tauopatie, neurozápal

Účel projektu: základný výskum

Podrobný účel postupu:

Mozgovno-cievna bariéra (MCB) je tvorená vrstvou endotelových buniek, ktoré sa nachádzajú na povrchu mozgových ciev. Susedné endotelové bunky sú k sebe pevne pútané pomocou tzv. tesných spojov, ktoré medzi mozgovým tkanivom a krvným riečišťom tvoria fyzickú bariéru. Celistvosť MCB zaisťuje iónovú homeostázu, nevyhnutnú pre neuronálnu aktivitu, správny tok živín z krvi do mozgu a zároveň tiež chráni centrálny nervový systém (CNS) pred vniknutím potenciálne škodlivých látok (cirkulujúce makromolekuly, toxíny, patogény, a iné). Je všeobecne známe, že zoznam ochorení CNS zahŕňajúcich poškodenie MCB neustále narastá. Medzi tieto ochorenia zaradujeme aj neurodegeneratívne tuopatie, ako napríklad Alzheimerovu chorobu, Pickovu chorobu, frontotemporálnu demenciu, kortikobazálnu degeneráciu a ďalšie. Dostupnosť transgénnych potkaních modelov (SHR-72, SHR-24 a WISTAR-72) nám umožňuje pozorovať zmeny odohrávajúce sa v MCB v priebehu neurodegenerácie spôsobenej výhradne tau proteínom, bez ohľadu na amyloidovú zložku.

Cieľom projektu je charakteristika rozsahu poškodenia mozgovno-cievnej bariéry u transgénnych potkaních modelov (SHR-72, SHR-24 a WISTAR-72) v prostredí neurodegenerácie spôsobenej tau proteínom a porovnanie poškodení u jednotlivých línií transgénnych zvierat. Poškodenie MCB bude pozorované na viacerých úrovniach:

a, biochémia – sledovanie koncentrácií markerov prestupu v plazme a v mozgovom tkanive:

- pre malé molekuly (sodná soľ fluoresceínu)
- pre proteíny (Evansova modrá)

b, histológia – sledovanie prestupu sérových proteínov do jednotlivých častí mozgu

c, elektrónová mikroskopia – zmeny na úrovni ultraštruktúry neurovaskulárnej jednotky

d, transkriptomické štúdie buniek MCB

e, proteomická analýza buniek MCB

Celkom bude použitých 475 zvierat v rôznych vekových kategóriách:

Transgénne zvieratá/ Celkový počet - 285									
	1-mes.	2-mes.	4-mes.	6-mes.	8-mes.	10-mes.	12-mes.	14-mes.	16- mes.
SHR24	15	15	15	15	15	15	15	15	15
SHR72	15	15	15	15	15	-	-	-	-
W72	15	15	15	15	15	-	-	-	-

Kontrolné zvieratá/ Celkový počet 190									
	1-mes.	2-mes.	4-mes.	6-mes.	8-mes.	10-mes.	12-mes.	14-mes.	16- mes.
Kontroly SHR (24)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Kontroly SHR (72)	10	10	10	10	10	-	-	-	-
Kontroly Wistar	10	10	10	10	10	-	-	-	-

Prínos z vykonaného projektu:

V oblasti vývoja nových terapeutík centrálnej nervovej sústavy predstavuje hematoencefalická bariéra veľkú prekážku a je jedným z najvýznamnejších limitujúcich faktorov. Štúdium problematiky mozgovo-cievnej bariéry patrí medzi významné kroky vývoja nových terapeutických a diagnostických prístupov v oblasti liečby neurodegeneratívnych a neurologických ochorení. Získané poznatky by mohli v budúcnosti slúžiť ako základ pre predklinické a klinické skúšanie nových liečebných postupov v odboroch humánnej medicíny a farmakológie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Predpokladané približné počty zvierat použité počas trvania projektu:

Potkan laboratórny (samec, samica) 190

Transgénny potkan (SHR 24, SHR 72, W72/samec, samička) 285

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

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 experimentov.

Na charakterizáciu poškodenia MCB v jednotlivých transgénnych líniiach bude použitých 475 zvierat. Počet zvierat zohľadňuje biologickú variabilitu a potrebu viacerých zvierat pre proteomické a transkriptomické experimenty (minimálne potrebné množstvo tkaniva).

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

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

Zvieratám nebude aplikovaná žiadna látka, okrem intraperitoneálnej aplikácie anestetika. Následne v hlbkej anestéze budú zvieratá perfundované a odobrané mozgové tkanivo.

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.	Slabá
Transkardiálna perfúzia	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom.	Stredná
Celkové hodnotenie krutosti štúdie		Stredná

Zohľadnenie 3R

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

Redukcia: V navrhovaných experimentoch budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Transgénne potkany budú krížené iba v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov. Navrhované počty zvierat sú nevyhnutné pre spoľahlivé štatistické vyhodnotenie výsledkov a predstavujú predpokladané maximálne počty; akonáhle sa podarí získať dostatočné množstvo dát, zvyšné zvieratá nebudú použité.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v ľudskom mozgu, súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje nahradiť poznatky získané zo živého mozgového tkaniva animálnych modelov za poznatky, ktoré pochádzajú z in vitro experimentov. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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. Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu ani kumulatívnej účinku.

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii, z ktorej sa už zvieratá neprebudia. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pri vývoji nových terapeutík pre neurodegenerácie.

Začiatok pokusu je plánovaný na 23.4. 2019 a bude sa realizovať do 31.12. 2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Názov projektu: Imunoterapia Alzheimerovej choroby: testovanie účinnosti aktívnej a pasívnej vakcíny

Kľúčové slová v projekte: Alzheimerova choroba, imunoterapia, imunizácia, dávka imunogénu

Účel projektu: Základný výskum

Podrobný účel postupu:

V populácii stúpa každý rok počet pacientov s Alzheimerovou chorobou. Súčasná terapia je zameraná na symptomatické potlačenie ochorenia a podporné mechanizmy, ale nerieši kauzálny prístup. Aj preto sa v súčasnosti hľadajú nové prístupy a spôsoby terapie, ktoré by vedeli ovplyvniť molekulárne mechanizmy zodpovedné za prepuknutie a progres ochorenia. Jedným z možných terapeutických prístupov je pasívna a aktívna imunoterapia Alzheimerovej choroby. Pri vývoji vakcín je dôležité stanoviť optimálnu dávku, ktorá by mala vyvolať protektívnu protilátkovú alebo bunkovú imunitnú odpoveď. Z uvedeného dôvodu je vzťah „dose-response“ dôležitým kritériom prípravy efektívnej vakcíny či už bunkového alebo protilátkového typu.

Predložený projekt má za úlohu testovať účinnosť aktívnej a pasívnej vakcíny na transgénnych myšiach modeloch Alzheimerovej choroby. Pri testovaní aktívnej vakcíny budeme sledovať vplyv veľkosti dávky vakcíny na hladinu indukovaných protilátok a terapeutickú účinnosť vakcíny. Zvieratám bude v 4 týždňových intervaloch subkutánne aplikovaná vakcína (imunogén) s cieľom vyvolať dostatočnú hladinu protilátok navodzujúcu terapeutický efekt. Pri testovaní pasívnej vakcíny (myšia monoklonová protilátka) budeme sledovať vplyv dávky na terapeutickú účinnosť vakcíny u transgénnych myší. Monoklonová protilátka bude zvieratám aplikovaná intraperitoneálne v dvojtýždňových intervaloch.

Pred dosiahnutím terminálneho štádia zvierat (v závislosti od použitia línie a jej prežívania, 1 mesiac pred plánovaním usmrčovania zvierat) budú zvieratá testované v behaviorálnych testoch - Morrisovo vodné bludisko, test rozpoznávania objektu, catwalk.

Dva týždne po poslednej dávke (po ukončení imunizačnej schémy) sa zvieratám odoberie krv z očného splavu v ľahkej isofluranovej anestézii. V jednotlivých sérach bude stanovovaná hladina špecifických protilátok, ktoré boli indukované aktívnou vakcínou a tiež kvantifikované množstvo voľného tau proteínu v krvi. Celkový objem odobratej krvi od každého zvieratá neprekročí stanovené normy. Po odbere krvi budú zvieratá transkardiálne perfundované v celkovej anestézii na získanie mozgového tkaniva. Mozgové tkanivá budú použité na imunohistochemickú a biochemickú analýzu terapeutického efektu vakcíny (kvantifikácia patologických štruktúr tau a sarkozyl-nerozpusťných foriem tau proteínu v mozgu).

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Preštudovali sme všetky dostupné alternatívne prístupy, ktoré by umožnili v danom experimente nahradiť zvieratá za iný biologický testovací systém. Na selekciu optimálnej dávky vakcíny a jej terapeutického účinku je však nevyhnutné použiť imunitný systém transgénnych zvierat. Na tento typ experimentov použijeme transgénne myši exprimujúce rôzne formy tau proteínov. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty

-transgénni myš (samička, samec) 240

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

Zvieratá po injekcii imunogénu sú monitorované a v prípade neadekvátnej reakcie – výrazná triaška, apatia, upovedomí sa veterinárny lekár a vedúci experimentu a po posúdení zdravotného stavu sa rozhodne o human end point.

Vakcinácia nemá kumulatívny účinok, zvyšuje sa len miera imunitnej odpovede po niekoľkonásobnom podaní.

Pred začatím experimentu sú zvieratá handlované, aby si privykli na experimentátora a redukovali sme stres zvierat.

Human end point:

	Prejav	Skóre			
1	Akýkoľvek stav vedúci k dlhotrvajúcej alebo nezvratnej neschopnosti prijímať potravu alebo vodu (dlhodobá nehybnosť, letargia...)	0	1	2	3
2	Stavy, ktoré poukazujú na silnú bolesť, strach alebo utrpenie (autoindukovaná trauma, hrbenie, vokalizácia, abnormálne pohyby, otvorené rany,...)	0	1	2	3
3	Rýchla alebo pretrvávajúca strata hmotnosti (>15% očakávanej hmotnosti)	0	1	2	3
4	Zovšeobecnené zníženie starostlivosti a abnormálny vzhľad počas dlhého časového obdobia (naježená srst', rozsiahla alopecia,...)	0	1	2	3
5	Ťažké alebo pretrvávajúce ťažkosti s dýchaním	0	1	2	3

Hodnotenie:

0 - bez príznakov

1 - mierny príznak

2- stredne silný príznak / konzultácia s veterinárnym lekárom

3- silný príznak -eutanázia

Každý znak sa zhodnotí na základe bodovania 0-3, pričom 0-bez príznakov, 3- silný príznak. Výsledné skóre je súčtom jednotlivých pozorovaných príznakov.

Každé zviera, ktoré bude prejavovať stredne silný príznak bude presunuté do kliečky s neobmedzeným prístupom ku krmivu a tekutinám, bude neustále monitorované a jeho stav bude konzultovaný veterinárnym lekárom. Každé zviera prejavujúce silný príznak v ktoromkoľvek prejave, prípadne pri súčte bodov viac ako 8, bude vyradené z experimentu a humánne usmrtené.

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 (každé 2 týždne)/pasívna imunizácia	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Opakovaná aplikácia. Trvanie 0.5-1 minúta.	Stredná
Krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (1x za mesiac)/aktívna imunizácia	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Opakovaná aplikácia. Trvanie 0.5-1 minúta.	Stredná
Behaviorálne testovanie	Morisovo vodné bludisko, catwalk, test rozpoznávania nového objektu. Pred začatím testovania sú zvieratá handlované, aby sa minimalizoval stres. Bolesť slabá.	Slabá
Stav zvierat počas obdobia prežívania	Nepredpokladáme nepriaznivé účinky, zvieratá reagujú na podanie imunogénu dobre. Bolesť slabá až stredná.	Slabá-stredná

Odber krvi (retroorbitálny plexus)	Štandardná metóda. Zviera sa v sedácii fixuje za kožnú riasu na krku, sklenená kapilára sa jemne zasunie do vnútorného očné kútika a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá až stredná. Trvanie max. 1 minúta.	Stredná
Transkardiálna perfúzia v celkovej anestézii	Otvorenie hrudnej dutiny a zavedenie ihly do ľavej komory srdca. Cez ihlu bude prenikať do celého tela zvieraťa roztok PBS s heparínom. Bolesť stredná	Stredná
Celkové hodnotenie krutosti štúdie		Stredná

Zohľadnenie 3R

Zjemnenie:

Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné ŠPP. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociologickým potrebám, v klietkach s obohatením prostredím. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. V chovnom zariadení je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvieraťa.

Vakcinácia nemá kumulatívny účinok, zvyšuje sa len miera imunitnej odpovede po niekoľkonásobnom podaní. Bezprostredne po aplikácii môžeme u niektorých jedincov pozorovať miernu apatiu alebo naopak zvýšenú aktivitu, ktorá odznej v priebehu pár minút. Pri pretrvávajúcich príznakoch (triaška), zviera oddelíme a umiestnime na výhrevnú podložku až do zotavenia. V prípade vytvorenia rán v mieste vpichu ranu ošetríme prípravkom Betadine a v nasledujúcich dňoch pozorujeme. V prípade výskytu mokvajúcich rán, miesto vpichu ošetríme dermálnou masťou Kalcium Panthotenicum a izolujeme, aby sme zabránili ďalšiemu poraneniu zvieraťa ostatnými zvieratami.

V čase začatia imunizačnej schémy zvieratá nevykazujú fenotyp. Transgénne línie prejavujú fenotyp až v terminálnom štádiu, t.j. posledné týždne, patológia sa hodnotí predovšetkým post mortem – prítomnosť neurofibrilárnej patológie

Pred začatím experimentov, sú zvieratá handlované a privykajú si na experimentátora. Intrakardiálna perfúzia sa vykonáva v celkovej anestézii.

Redukcia:

Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov. Stanovený počet zvierat sa opiera o naše predchádzajúce experimenty. Ukázalo sa, že počet zvierat v skupine menší ako 20 nie je dostatočne štatisticky relevantný, keďže aj u zvierat sa vyskytuje určitá miera variability, predovšetkým pre analýzu behaviorálnych testov je nevyhnutné použitie vyššieho počtu zvierat pre jednotlivé skupiny.

Nahradenie:

Súčasná úroveň vedeckého poznania neumožňuje testovať efektívnosť vakcín (pasívnych aj aktívnych) v *in vitro* podmienkach. Z legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať priamo na ľudoch, bez predchádzajúceho otestovania na laboratórnych zvieratách.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Utrpenie versus prínos

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu. Zvieratá dostávajú nízke dávky netoxickéj monoepitopovej vakcíny alebo nízke dávky protilátky, ktoré nespôsobujú žiadnu nebezpečnú reakciu, ktorá by viedla k poškodeniu organizmu. Subkutánna aj intraperitoneálna aplikácia vakcíny trvá niekoľko sekúnd. Odber krvi sa vykonáva na sedovaných zvieratách. Po odbere krvi budú zvieratá transkardiálne perfundované v celkovej anestézii s následným odberom mozgového tkaniva. Získané informácie z predkladaného experimentu významne napomôžu pri vývoji efektívnej vakcíny zameranej na liečbu ľudských neurodegeneračných ochorení.

Začiatok pokusu je plánovaný na 23.4.2019 a bude sa realizovať v priebehu dvoch rokov, do 31.12.2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

Názov projektu: Sledovanie účinnosti vakcíny na animálnych modeloch exprimujúcich infekčné formy tau proteínu

Kľúčové slová v projekte: Alzheimerova choroba, tauopathy, spreading tau, tau proteom

Účel projektu: Základný výskum

Podrobný účel projektu:

Daný projekt nadväzuje na náš predchádzajúci, už schválený projekt, cieľom ktorého bolo identifikovať jednotlivé kmene infekčných foriem patologicky pozmeneného proteínu tau, ktoré sú zodpovedné za šírenie neurofibrilárnej patológie v mozgu pacientov postihnutých neurodegeneračnými tauopatiami (napr. Alzheimerova choroba). Keďže patologicky pozmenený proteín tau je tvorený stovkami rôznych kmeňov, z ktorých pravdepodobne len niektoré disponujú infekčnými vlastnosťami, je nevyhnutné identifikovať práve tie, ktoré sa dokážu šíriť v mozgu a v tomto procese navodzovať neurofibrilárne zmeny. Tieto poznatky je možné získať po vpravení presne ocharakterizovaných kmeňov proteínu tau do mozgu experimentálnych myší a sledovať šírenie jednotlivých kmeňov v animálnom modeli.

Pre účely projektu sa bude používať mozgové tkanivo pacientov postihnutých Alzheimerovou chorobou (AD) a ďalšími tauopatiami (Pickova choroba a PiD, Progresívna supranukleárna obrna PSP, Kortikálna degenerácia CBD) poprípade mozgové tkanivo transgénnych modelov. Ľudské alebo animálne izoláty budú následne rozdelené do jednotlivých frakcií, z ktorých získame na základe veľkosti rôzne kmene tauónov. Takto pripravené formy proteínu tau budú vpravené do mozgovej kôry a hipokampu, prípadne aj do iných častí mozgového tkaniva animálnych modelov. Budú sa využívať transgénne aj netransgénne myšacie línie, keďže je silný predpoklad, že rôzne kmene majú v jednotlivých líniiach rozdielny potenciál vyvolať šírenie neurofibrilárnej patológie.

Na základe výsledkov v predchádzajúcom projekte, kde sa nám podarilo vytvoriť patológiu v nami určenej oblasti mozgu (hipokampus) a taktiež vyvolať šírenie neurofibrilárnej patológie v myšacích modeloch, hlavným cieľom tohto projektu bude použiť tieto nami vytvorené modely na testovanie účinnosti aktívnej a pasívnej vakcíny, ktoré sú jedným z možných terapeutických prístupov pri liečbe Alzheimerovej choroby.

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Keďže progres neurodegeneračných zmien prebiehajúcich v mozgu pacientov postihnutých niektorou z tauopatií, ako aj získanie kompletnej imunitnej odpovede mozgu na podnet, akým je prítomnosť infekčných foriem proteínu tau, nie je možné simulovať v podmienkach in vitro, animálne modely pre nás ostávajú aj naďalej jedinou možnou variantou schopnou poskytnúť údaje, ktoré sa v čo najväčšej miere približujú procesom odohrávajúcim sa v mozgu pacientov. Jednotlivé formy proteínu tau budú ocharakterizované a vpravené do mozgovej kôry a hipokampu experimentálnych myší. Takýmto spôsobom identifikujeme kmene, ktoré sú schopné infikovať neuróny a šíriť sa v mozgu.

Po vpravení izolátov a vyvolaní šírenia sa neurofibrilárnej patológie budú tieto nami vytvorené modely následne použité na sledovanie účinnosti aktívnej a pasívnej imunizácie.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Predpokladané približné počty zvierat na plánované trvanie projektu:

Transgénna myš (samička, samec) 400ks

Všetky experimentálne zvieratá použité v projekte budú geneticky modifikované zvieratá.

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

Všetky navrhované experimentálne postupy používajú štandardné zavedené minimálne invazívne

zátkroky, ktoré minimalizujú nepriaznivý dopad na experimentálne zvieratá. V priebehu pooperačnej starostlivosti budú zvieratám podávané analgetiká na zmiernenie slabej až strednej bolesti. Počas obdobia prežívania budú zvieratá denne kontrolované a podľa potreby im budú podávané analgetiká. Zvieratá pripravované na behaviorálne testovanie budú dôsledne handlované, tréňované a monitorované, aby sa minimalizoval stres v priebehu tréningu a experimentu. Iba zvieratá zotavené po stereotaktickej aplikácii, bez príznakov bolesti a známok infekcie, budú použité na imunizáciu.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera
Vázenie zvierat	Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolest' slabá. Trvanie 1-2 minúty.
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetik	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' slabá. Trvanie 30 sekúnd.
Stereotaktická aplikácia v celkovej anestézii	Štandardná metóda. Nastrihnutie kože na hlave (1 cm rana), vyvrtanie malého otvoru do lebky (1mm), aplikácia izolátu do cieľenej oblasti mozgu, zošitie rany. Pooperačná bolesť bude utlmená analgetikami. Trvanie 1-60 minút. Bolest' stredná.
Stav zvierat po stereotaktickej aplikácii izolátu do mozgu	Zvieratá reagujú veľmi dobre na intracerebrálnu aplikáciu. Pooperačná bolesť je tlmená analgetikmi. Bolest' slabá až stredná.
Aktívna imunizácia/krátkodobá fixácia a subkutánna injekcia (4-6x v mesačných intervaloch)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu na krku. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Opakovaná aplikácia. Bolest' stredná. Trvanie 1 minútu.
Pasívna imunizácia/ krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia (8-12x v 2-týždňových intervaloch)	Štandardná metóda. Zviera sa fixuje za kožnú riasu v chrbtovej polohe. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Opakovaná aplikácia. Bolest' stredná. Trvanie 1 minútu.
Stav zvierat po injekcii	Zvieratá môžu byť mierne stresované v dôsledku aplikácie subkutánnej/intraperitoneálnej injekcie. Z doterajších skúseností počas experimentu zvieratá na podanie imunogénu reagovali dobre, neboli zaznamenané nepriaznivé vplyvy na zvieratá. Bolest' slabá.
Behaviorálne testovanie	Morrisovo vodné bludisko, catwalk, Test rozpoznávania nového objektu. Pred začatím testovania sú zvieratá handlované, aby sa minimalizoval stres. Bolest' slabá.
Stav zvierat počas obdobia prežívania	Nepredpokladáme nepriaznivé účinky, zvieratá reagujú na podanie imunogénu dobre. Bolest' slabá až stredná.
Odber krvi (retroorbitálny plexus) v ľahkej isofluranovej anestéze	Štandardná metóda. Zviera sa po uvedení do slabej inhalačnej anestézie fixuje za kožnú riasu na krku, sklenená kapilára sa jemne zasunie do vnútorného očného kútika a krúživým pohybom sa mierne naruší retroorbitálny plexus. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolest' slabá. Trvanie max. 1 minúta.
Transkardiálna perfúzia zvierat	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii

	transkardiálne perfunduje štandardným roztokom (PBS s heparínom, PFA).Prebehne v celkovej anestézii, z ktorej sa zviera už neprebudí. Bolesť stredná
Celkové hodnotenie krutosti	Stredná

Zjemenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať interné štandardné pracovné postupy. So zvieratami sa bude zaobchádzať humánne a nebude sa im vyvíjať prebytočný stres. Zvieratá budú chované max. v počte 5 zvierat na chovnú nádobu v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociologickým potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. V zverinci je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Chirurgické zákroky budú prebiehať v celkovej anestézii, po jej ukončení budú zvieratám podávané analgetiká na tlmenie bolesti, intrakardiálna perfúzia s roztokom PBS a 4% paraformaldehydrom prebehne tiež v celkovej anestézii.

Zdravotný stav každého zvieraťa bude hodnotený pri každom pozorovaní na základe hlavných štyroch znakov: *letargie (lethargy), hrbenia (hunching), naježenej srsti (piloerection), straty váhy >15 % očakávanej hmotnosti (weight loss). Hodnotenie jednotlivých znakov je uvedený v tabuľke human end point.

Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvieraťa

Redukcia: V navrhovaných experimentoch budeme využívať zvieratá z vlastného chovu tak, aby sa minimalizoval počet pokusných zvierat. Transgénne myši budú krížené iba v počtoch nevyhnutných pre získanie potrebného množstva údajov. Stanovený počet zvierat je minimalizovaný v čo najvyššej možnej miere a zároveň zabezpečujúci štatistickú relevantnosť dosiahnutých výsledkov.

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov, ktoré sa odohrávajú v ľudskom mozgu, nie je možné sledovať šírenie infekčných foriem proteínu tau v in vitro podmienkach a zároveň získať výsledky, ktoré by čo najvernejšie odzrkadľovali tieto procesy. Takisto nie je možné sledovať biologickú účinnosť peptidového imunogénu v in vitro podmienkach. Z etického a legislatívneho hľadiska nie je možné daný experiment vykonávať na humánnych pacientoch.

Zásada nahraditeľnosti zvierat

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

Príčina Alzheimerovej choroby a príbuzných tauopatií zostáva neznáma. Na pochopenie kompletnej patogenézy týchto neurodegeneračných ochorení je nevyhnutné pochopiť kompletnú kaskádu dejov a ich spúšťačov. Je známe, že neurofibrilárna patológia sa šíri v mozgu pacientov v časovo a anatomicky definovaných sekvenciách, avšak konkrétne kmene patologicky pozmeneného proteínu tau zodpovedné za infekčné vlastnosti a schopnosti šírenia neboli doposiaľ identifikované a charakterizované. Predpokladaný prínos projektu zahŕňa identifikáciu kmeňov s infekčnými vlastnosťami a schopnosťou šírenia v mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou a tiež popísanie vplyvu úrovne neurozápalu na šírenie neurofibrilárnej patológie.

Identifikované infekčné kmene tau proteínu (schopné vyvolať a šíriť neurofibrilárnu patológiu) budú vpravené do mozgu experimentálnych zvierat a následne budeme sledovať účinnosť vakcíny na týchto zvieratách, ako možný terapeutický prostriedok v boji proti neurodegeneratívnym ochoreniam.

Počas všetkých úkonov eliminujeme stres a utrpenie zvierat, t. z. všetky úkony na zvieratách, ako intracerebrálna injekcia a perfúzia, budú prebiehať v úplnej anestézii a po prebratí z anestézie budú zvieratám podávané analgetiká.

Začiatok pokusu je plánovaný na 20.4.2019 a bude sa realizovať počas nasledujúcich troch rokov, do 31.12.2021.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

A

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU Č. 39**Názov projektu:**

Meranie telesnej teploty u králikov za použitia podkožného snímača teploty - loggera STAR ODDI DST micro-T s následnou aplikáciou vyvíjanej modifikovanej očkovacej látky celobunečnej absorbovanej vakcíny proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1062/19-221/3

Kľúčové slová v projekte: králik, imunita, Bordetella Pertussis, očkovacia látka

Účel projektu: Translačný výskum/Vývoj, výroba alebo testovanie kvality, účinnosti a bezpečnosti liekov

Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

Králik domáci je najvhodnejší zvierací model na testovanie pyrogénnych látok a imunogenicity po podaní celobunkovej vakcíne proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu (Bordetella Pertussis). Udáva sa, že králik domáci je porovnateľne citlivý na podanie očkovacej látky ako dieťa. Aktuálne vakcinačné programy vo vyspelých krajinách zahŕňajú prevažne vakcináciu polyvalentnou DTPaP vakcínou, ktorá zahŕňa aj vakcínu proti toxínu baktérii *Bordetella Pertussis*. V minulosti bolo používanie celobunečnej vakcíny proti čiernemu kašľu vytlačené aktuálne používanou acelulárnou vakcínou, z dôvodu častého výskytu nežiadúcich účinkov ako horúčka a febrilné kŕče a následnej silnej antivakcinačnej lobby. Vyvíjaná celobunková vakcína proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu, ktorá bude aplikovaná v tomto projekte, bude obsahovať geneticky detoxifikované a chemicky usmrtené bunky baktérie *Bordetella Pertussis* a je formulovaná pomocou *aluminium hydroxid* nosiča tak, aby poskytovala maximálnu imunogenicitu a minimalizovala nežiaduce účinky typu zvýšenie teploty.

Účelom skúšky je určiť telesnú teplotu u králikov za použitia podkožného snímača teploty – loggera s následnou aplikáciou očkovacej látky proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu. Pre porovnanie s vyvíjanou očkovacou látkou budeme pri skúškach používať 2 skupiny kontrolných zvierat: zvieratá vakcinované nemodifikovanou celobunečnou vakcínou proti DTP a zvieratá, ktorým bude podaný fosfátom tlmený fyziologický roztok- PBS.

Cieľom projektu je sledovať u králikov zvyšovanie sa telesnej teploty použitím podkožných snímačov teploty - STAR ODDI DST micro-T po podaní testovaného prípravku a kontrolných prípravkov. Snímač telesnej teploty bude umiestnený kontralaterálne za lopatku do operačne vytvorenej podkožnej kapsy. Králiky budú v celkovej anestéze. Anestézu vykoná zmluvný veterinárny lekár. Pri návrhu skúšky vychádzame z dostupných publikácií, ktoré pojednávajú o použití králikov pri teste celobunečnej vakcíny proti *Bordetella Pertussis* na pyrogény (Verwer *et al.*, Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling, Lab. Anim. 2009, 43: 155, Kaaik *et al.*, Nonclinical vaccine safety evaluation: advantages of continuous temperature monitoring

using abdominally implanted data loggers, J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 521–526; Dias et al, An improved whole pertussis vaccine with reduced content of endotoxin, Human vaccines and immunotherapeutics, 9:2, 339 – 348, February 2012). Podľa týchto publikovaných štúdií, nárast teplôt u králikov bol pozorovaný v rozmedzí 5-12 hodín po podaní celulárnej vakcíny s najvyšším nárastom teplôt pri 8 hodinách od podania. Z týchto publikácií zároveň vyplýva, že vzostup teplôt je pomerne nízky v rozmedzí cca 0,5-1°C. Dôležitú úlohu pri celom teste hrá jemná manipulácia so zvieratami a návyk králikov na personál a procedúry, ktoré sú na nich počas skúšky vykonávané. Nevhodné zaobchádzanie, či nové stimuly totiž môžu navodiť stresový stav a vzostup telesnej teploty králikov, čo povedie k skresleniu výsledkov skúšky.

Prínosy z vykonaného projektu:

Novo vyvíjaná celobunková vakcína proti záškrtu, tetanu a čiernemu kašľu, ktorá bude aplikovaná v tomto projekte obsahuje geneticky detoxifikované a chemicky usmrtené bunky baktérie Bordetella pertussis a je formulovaná pomocou adjuvansu aluminium hydroxid tak, aby poskytovala maximálnu imunogenicitu a minimalizovala nežiaduce účinky typu zvýšenie teploty. Prínos z aplikácie podkožných snímačov je mnohonásobný oproti potrebe merať teplotu králikom rektálne. Nie je možné, aby králiky pomocou rektálnych sond (teplomerov) boli sledované takmer dva dni neprestajne aby sme „nezmeškali“ nástup a odznenie zvýšenia telesnej teploty odozvou imunitného systému na pôsobenie modifikovanej očkovacej látky.

Poznatky získané riešením projektu prispievajú k celosvetovému poznaniu vakcinácie proti čiernemu kašľu.

Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:

V projekte budeme vykonávať operačný zákrok aplikácie podkožného snímača telesnej teploty a parenterálnu aplikáciu testovaného prípravku a kontrolných prípravkov. Môžeme predpokladať ujmu ako začervenanie, zápal, opuch v mieste operačného poľa a v mieste aplikácie testovacieho prípravku a kontrolných prípravkov môžeme pozorovať postvakcinačnú hrčku, bolestivosť, zvýšená teplota v mieste vpichu, opuch.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabé
Krátka fixácia pri aplikácii	Krátkodobý mierny stres	slabé
Jednorázová i.m. aplikácia test. látky	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Opakovaná i.m. aplikácia ATB a analgetík	Krátkodobé obmedzenie, bolesť stredná	stredné
Aplikácia podkožného snímača	Chirurg. zákrok v celkovej anestézii	stredné
Rekonvalescencia po chirurgickom. zákroku	V prípade bolestí podávanie analgetík	slabé
Testovanie očkovacej látky	Zvýšená telesná teplota prípadne, možný nástup závažného ochorenia vedúceho úhynu	kruté

Predpokladaná úroveň krutosti: Kruté

Počet a druh pokusných zvierat

Králik domáci, samice, 40 ks zvierat pre testovanie každej vyrobenej šarže RALDITEPERY.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné vyhodnotenie výsledkov zmien v vzostupe telesnej teploty u králikov po podaní očkovacej látky. Nie je možné nahradiť postup na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. So zvieratami budú zaobchádzať zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami. Zásada zjemnenia bude dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prejdú zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvyknú na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Po operačnom zákroku bude zvieratám poskytnutá maximálna starostlivosť, v prípade potreby aj následné podávanie analgetík. Humane end point nastane v prípade zhoršeného zdravotného stavu zvierat s prejavmi bolesti, prípadne úbytku hmotnosti o viac ako 25% alebo podľa dosiahnutého príslušného skóre vo vypracovanom Humane end point. Postup bude ukončený a pod dohľadom zmluvného veterinárneho lekára zvieratá usmrtené.

Projekt bude podliehať opätovnému schváleniu: áno nie

3 mesiace po ukončení projektu

Netechnického zhrnutia projektu

Názov projektu: Využitie regulácie angiotenzínových receptorov v neuroprotekcii po traumatickom poranení miechy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1066/19-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): traumatické poranenie miechy, AT1 receptor, AT2 receptor, neuroprotektia.

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:

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

Traumatické poranenie miechy predstavuje vážny medicínsky problém, ktorý výrazne ovplyvňuje kvalitu života postihnutých jednotlivcov. Intenzívny výskum mechanizmov poškodenia miechy priniesol v posledných rokoch množstvo sľubných terapií, ale výsledky klinických skúšok boli prevažne negatívne a žiadna z nich nebola úplne akceptovaná pre ich uplatnenie v klinickej praxi. Rozsah sekundárneho poškodenia je pre mnohých pacientov limitujúcim faktorom, ktorý ovplyvňuje funkčnú obnovu. Naša stratégia v liečbe traumou poškodenej miechy spočíva na potlačení sekundárneho poškodenia prostredníctvom simultánnej stimulácie AT2 receptorov a blokovania AT1 receptorov.

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

Potlačenie sekundárneho poškodenia miechy po mechanickej traume umožní zachovať väčšie množstvo nervového tkaniva, čím sa vytvoria lepšie podmienky pre regeneráciu a následnú obnovu nervového tkaniva, a tým funkcie miechy. V experimentoch budú merané indikátory axonálneho rastu, angiogenézy, pro-zápalové markery, aktivácia mikrogliie a astrocytov, infiltrácia makrofágov, a kvantifikácia demyelinizácie, myelinizovaných a nemyelinizovaných axónov, rostro-kaudálna dĺžka a objem poškodenia, množstvo zachovaného tkaniva, a tieto výsledky budú korelované s funkčnou obnovou miechy. Keďže doteraz neexistuje účinná terapia v poškodení miechy, aj malý pokrok by posunul modernú traumatológiu o veľký krok dopredu.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité dospelé laboratórne potkany (váha 250-320g) kmeňa Wistar samice v počte 224ks na celú dobu riešenia.

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

Kompresia miechy bude uskutočnená za celkovej inhalačnej anestézy z jej dorzálnej strany, 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 poranení miechy zachované iba čiastočne. Zvieratá by mali byť po prebratí z anestézy schopné pohybu za pomoci predných labiek, čiže schopné sa sami napiť a nakrmiť. Keďže zvieratá budú po operáciách pociťovať bolesť, bude im potrebné aplikovať analgetiká. Sprievodným javom vykonaného postupu traumatického poranenia miechy je prechodná dysfunkcia močového mechúra. Postupne u zvierat dochádza k obnove tejto funkcie a do 3 týždňov (podľa doterajších skúseností) sú všetky zvieratá schopné močiť samostatne. V priebehu 4 týždňov bude zvieratám opakovane podávaný stimulátor AT2 receptorov (i. p.) a blokátor AT1 receptorov (s. c.) a vykonávané behaviorálne testy.

Predpokladaná úroveň krutosti:

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

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Poranenie miechy ako aj následná regenerácia sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Okrem toho, pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože sa na konci experimentov je potrebné urobiť testovanie neurologickej funkcie zadných končatín, ktorého výsledky odzrkadľujú rozsah patofyziologických účinkov poškodenia.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 239 ks zvierat bolo stanovené vzhľadom k tomu, že (1) plánovaný počet 10 kusov zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia miechy a určenie neuroprotektívneho vplyvu; (3) traumou poškodená miecha nemôže byť použitá zároveň na

biochemické, histologické, imunohistochemické analýzy a tzv. Angiotensin receptor binding metódu.

3. Zjemnenie:

(Vysvetliť výber použitých druhov zvierat, zdôvodnenie použitia zvieraťa, objasnenie spôsobu ako sa minimalizuje stres, utrpenie a bolesť zvierat v priebehu vykonávania postupu tak, aby sa dosiahli vedecké ciele projektu)

Všetky operačné zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané pod celkovou anestézou, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé. Po vykonaní chirurgických úkonov bude zvieratám subkutánne podaný sterilný fyziologický roztok z dôvodu prevencie dehydratácie. Až do prebratia z anestézy bude experimentálne zviera umiestnené na ohrievacej podložke nastavenej na teplotu 37,5°C. Experimentálne zvieratá budú po aplikácii terapeutického postupu umiestnené najprv individuálne a po zahojení operačných rán v pároch do kliebok, kde budú mať potravu a vodu *ad libitum*, a umiestnené vo zverinci. V priestoroch zverinca zotrvajú v mesačnom monitorovacom období, ktoré zahŕňa regeneračný proces traumou poranenej miechy. Monitorovacie obdobie začína dňom navodenia traumatického poranenia. Na základe našich skúseností s týmto kompresným modelom v predchádzajúcom projekte, zvieratá napriek paraplégii po zotavení z anestézy sú schopné pohybu v klietke za pomoci predných labiek. Napriek tomu, malé kúsky štandardnej potravy budú umiestnené priamo v klietke a v prípade potreby zvieratá napájané vodou pomocou striekačky. Zvieratám bude kontrolovaná váha prvý týždeň denne, neskôr každé 2-3 dni. Prijem vody u zvieraťa bude monitorovaný na základe spotreby vody v napájacej fľaši, plnosti močového mechúra a prítomnosti moču. Prijem potravy bude monitorovaný na základe spotreby štandardizovanej peletovej stravy a prítomnosti stolice. Celkový stav zvierat bude po postupe každodenne pozorovaný, a v prípade potreby sa im budú podávať analgetiká. Počas prežívania budú sledované ukazovatele ako spontánna regenerácia neurologického stavu, príjem potravy a tekutín, vyprázdňovanie močového mechúra, celková nepohoda. Prenášanie alebo zdvíhanie zvierat po traume miechy bude prevádzané chytením celého zvieraťa z dorzálny strany s prekříženými prednými labkami v blízkosti tela manipulujúcej osoby, a nie pomocou chvosta. V prípade dysfunkcie močového mechúra bude robené jeho manuálne vyprázdňovanie. Po vyprázdnení bude abdominálna časť zvieraťa umytá vlažnou vodou, osušená gázou a zviera umiestnené naspäť v klietke. Keďže obohatené prostredie znižuje stres a prispieva k lepšej regenerácii budú do kliebok umiestnené krátke plastové rúry a/alebo kartónové krabice poskytujúce pocit bezpečia potrebné pre zvieratá po náročnom zákroku.

Ukazovatele, ktoré budeme sledovať po Th9 kompresii	Bodové hodnotenie sledovaných ukazovateľov	Skóre, po dosiahnutí ktorého budú zvieratá humánne usmrtené
Spontánna regenerácia neurologického stavu	1,2	3
Prijem potravy	1,2	3
Vyprázdňovanie močového mechúra	1,2	3
Celková nepohoda	1,2	3

Bodové hodnotenie sledovaných ukazovateľov:

1-Zvieratá budú prejavovať slabú apatiu, budú mať prechodne zníženú chuť k jedlu, budú pociťovať slabú bolesť, budú menej čulé a budú mať prítomnosť krvi v moči

2- Zvieratá budú prejavovať apatiu, nechúť k jedlu, bolesť, nebudú čulé a budú mať prítomnosť krvi a hnisu v moči

3- Zvieratá budú humánne usmrtené, ak do dvoch týždňov po navodení Th9 kompresie nedôjde k spontánnej regenerácii neurologického stavu, ak po preliečení antibiotikami/analgetikami nedôjde k spontánnemu vyprázdňovaniu močového mechúra, keď zvieratá nebudú prijímať potravu a budú v celkovej nepohode.

Neurologický stav motorickej funkcie nemá vplyv na usmrtenie zvieratá. Zvieratá budú humánne usmrtené na konci doby prežívania za účelom odberu biologického materiálu.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

*Do 30.03.2023 musíme byť pripravení výsledky na
spätné posúdenie projektu.*