

**Netechnické zhrnutie projektu:**

1064/19-221/3

**Názov projektu:** Inteligentné nanopórovité systémy ako nosiče liečiv (INSTAL)

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** nanopórovitá silika, nosiče liečiv, i.v. podávanie, potkan, HPLC

**Účel projektu\*:** Základný výskum

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

**Opis cieľov projektu:**

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

Cieľom tohto projektu je biologické testovanie stability nanopórovitej siliky typu MCM-41 v živom systéme po uzavretí liečiva Naproxén do jej pórov na základe konformačnej zmeny trialkoxysilyl-derivátu kyseliny škoricovej, ktorý predstavuje nový typ ligandu viazaného na povrch siliky. Povrchový ligand uzavrie póry siliky, čo zabezpečí stabilitu tohto komplexu dovtedy, kým nedôjde k ožiareniu študovaných matric UV svetlom. Naším cieľom je poznanie stability tohto komplexu v živom organizme bez vplyvu UV svetla, ako aj efektivity uvoľňovania liečiva z pórov siliky po jeho pôsobení.

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

V súčasnosti existuje široké spektrum látok, ktoré sú v humánnej medicíne využívané v terapii rôznych typov ochorení, avšak efektívnosť terapeutického účinku liečiva je do veľkej miery ovplyvnená spôsobom jeho podávania a vplyvom prostredia na finálnu dávku (vstrebávanie, distribúcia, metabolizmus/degradácia podaného liečiva). Potenciálnym riešením tohto problému je vývoj nosičov liečiv, ktoré sú stabilné v prostredí živého organizmu a umožňujú ciele transport terapeutického účinku liečiva na miesto jeho pôsobenia. Existuje široké spektrum materiálov, ktoré sú v biomedicíne využívané ako nosiče liečiv (napr. polyméry, mikroguličky, dendriméry, liposómy), ktoré musia spĺňať špecifické kritériá ako je napr. vysoká afinita k liečivu, ktoré majú uzavrieť, efektívne uvoľňovanie liečiva v mieste pôsobenia, atď. Tento experiment bude založený na testovaní a poznaní stability nanočastíc oxidu kremičitého typu MCM-41 ako nosičov liečiv v živom systéme po modifikácii ich povrchu novým typom ligandu, ktorý dokáže efektívne uzavrieť liečivo do pórov siliky vplyvom UV svetla a následne póry vplyvom svetla otvoriť. Trialkoxysilyl-derivát kyseliny škoricovej by tak mohol byť sľubným kandidátom pre stabilizáciu komplexu silika-liečivo a mohol by potenciálne predstavovať nový typ ligandu využívaný pre modifikáciu povrchov nanočastíc na báze siliky v biomedicíne. Očakávame, že výsledkom tejto štúdie budú kvalitné dáta, ktoré prinesú nové poznatky o možnosti využitia a aplikácie nového typu nosiča liečiv v biomedicíne.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

laboratórne potkany, kmeň Wistar, 123 dospelých samcov (vek = 3 mesiace; hmotnosť ~ 350g)

**Humane end point**

Ak pri vyhodnotení skóre nižšie uvedených parametrov zaznamenáme akékoľvek negatívne zmeny zdravotného stavu alebo správania sa zvierat, budú tieto zvieratá dôkladne sledované. V prípade, že by nedošlo k zlepšeniu stavu a vyhodnotené skóre bude indikovať príznaky spadajúce do kategórie 3 bude experimentálny postup na danom zvierati humane ukončený predávkovaním nadmernou dávkou tiopentalu sodného.

|    | sledované parametre            | skóre            |                 |                 |                      |
|----|--------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
|    |                                | 0                | 1               | 2               | 3                    |
| 1. | príjem potravy/vody            | normálny         | znižený         | slabý           | <b>žiaden</b>        |
| 2. | hmotnosť                       | normálna         | -5%             | -10%            | <b>-20%</b>          |
| 3. | aktivita (v aktívnej fáze dňa) | normálna         | pokles aktivity | nízka aktivita  | <b>letargia</b>      |
| 4. | dýchanie                       | normálne         | plytké          | hlboké          | <b>rýchle</b>        |
| 5. | trávenie                       | normálny stolica | mäkká stolica   | vodnatá stolica | <b>krv v stolici</b> |

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

Zvieratám bude v narkóze *i.v.* podaná dávka experimentálneho roztoku (liečivo/nanopórovitá silika+liečivo). Nakoľko podávané injekcie budú sterilné a koncentrácia liečiva, ako aj siliky s liečivom neprekročí dávky, ktoré by mohli byť pre zvieratá letálne, predpokladáme, že po zásahu sa zvieratá zotavia a budú prežívať bez komplikácií. Vo vybraných časových intervaloch budú zvieratá usmrtené.

Zvieratá budú priebežne sledované zmluvným veterinárnym lekárom. V prípade zhoršenia zdravotného stavu (v dôsledku lokálneho zápalu po *i.v.* podaní alebo ožiarení UV svetlom), veterinárny lekár vyhodnotí potrebnú liečbu. V prípade, že dôjde ku manifestácii niektorého z vyššie uvedených prejavov (*humane end point*) a vážnemu zhoršeniu zdravotného stavu jedinca, bude vyhodnotené skóre a v prípade potreby bude postup ukončený uplatnením eutanázie.

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

1. Experimentálna skupina 1 – celkový stupeň krutosti: slabý
2. Experimentálna skupina 2 – celkový stupeň krutosti: slabý
3. Experimentálna skupina 3 – celkový stupeň krutosti: slabý
4. Experimentálna skupina 4 – celkový stupeň krutosti: slabý
5. Experimentálna skupina 5 – celkový stupeň krutosti: slabý

| úkon                                                       | stupeň krutosti                            |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| manipulácia so zvieratami, váženie, označovanie            | slabý                                      |
| chvosta nezmývateľnou fixkou                               |                                            |
| intraperitoneálna injekcia Zoletilu                        | slabý (vpich)                              |
| intravenózna injekcia liečiva Naproxén                     | slabý (vpich)                              |
| intravenózna injekcia nanopórovitej siliky s liečivom      | slabý (vpich)                              |
| bodové ožiarenie kože UV svetlom                           | slabý                                      |
| samostatné ustajnenie - sociálna izolácia                  | slabý                                      |
| potenciálna reakcia na <i>i.v.</i> podanie – lokálny zápal | slabý                                      |
| intraperitoneálna injekcia tiopentalu sodného              | slabý (vpich), resp. bez možnosti oživenia |
| cervikálna dekapitácia                                     | bez možnosti oživenia                      |

Jednotlivé dielčie kroky vykonané na zvieratách hodnotíme stupňom krutosti **slabý**. Celkový stupeň krutosti projektu pri zohľadnení jednotlivých krokov a kumulácie *i.p.* podávania anestetik hodnotíme ako **stredný**.

### Uplatňovanie zásad 3R

#### Nahradenie zvierat

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

Nahradenie experimentálnych zvierat iným experimentálnym modelom nie je možné vzhľadom na charakter experimentu. Nakoľko sa jedná o farmakokinetickú štúdiu, pri ktorej budeme analyzovať stabilitu modifikovanej nanopórovitej siliky v *in vivo* prostredí (telové tekutiny/tkanivo), nie je možné experimenty vykonať v *in vitro* podmienkach na bunkových kultúrach, nakoľko tento model by bol vhodný pre experimenty zamerané na štúdium transportu nosičov liečiv cez biologické membrány a ich osudu po vstupe do bunky (endozomálny transport/metabolizmus, atď.). Použitie animálneho modelu pre štúdium stability povrchovo modifikovanej siliky v živom organizme považuje za významné a kľúčové nakoľko dáta získané z experimentu by mohli byť v budúcnosti prínosom pre aplikáciu takto modifikovaných nanopórovitých materiálov v humánnej medicíne. Experimenty budú realizované na hlodavcoch, ktoré sú fylogeneticky bližšie človeku ako nižšie živočíšne druhy.

#### Redukcia počtu zvierat

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

Počet zvierat v experimentálnej skupine 1 a 2 predstavujú 4 jedince ( $n=4$ ); každý interval skupiny č. 3, č. 4 a č. 5 predstavuje 5 zvierat ( $n=5$ ). Tieto počty sme zvolili s ohľadom na nutnosť získať výsledky hodnotiť pomocou vhodných štatistických metód, aby boli objektívne a hodnoverné.

#### Zjemnenie

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

V experimente budú použité dospelé samce potkanov kmeňa Wistar. Samčie pohlavie bolo zvolené s ohľadom na prípadné rozdiely v dátach, ktoré by mohli vzniknúť v dôsledku odlišnej metabolickej aktivity, či hormonálnych rozdielov medzi samcami a samicami. V chovnom zariadení [REDACTED] majú experimentálne zvieratá komfortné podmienky ustajnenia, ktoré im nevyvolávajú zbytočný stres. Veľkosť a typ kliebok, počet zvierat v kletke, svetelný a kŕmny režim sú nastavené optimálne pre potreby experimentálnych zvierat. Kliebky sú pravidelne čistené a podstielky sú pravidelne menené zodpovedným pracovníkom, ktorý so zvieratami manipuluje šetrne. Zvieratá majú zabezpečený zdravotný dohľad veterinárnym lekárom počas celej doby experimentu. Počas priebehu experimentu budeme so zvieratami manipulovať opatrne. Na zjemnenie prípadnej bolesti, stresu a zníženie mobility počas *i.v.* aplikácie experimentálneho roztoku (liečivo/nosič liečiva) a následne pred dekapitáciou bude zvieratám podaná *i.p.* dávka anestetika. Tieto kroky sú zvolené tak, aby zvieratám spôsobovali minimálny stres, či poškodenie. Zvieratá budú sledované v celom priebehu experimentu pričom ich zdravotný stav bude hodnotený na základe skóre vybraných parametrov podľa humane end point.

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

## NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

### Názov projektu:

MOŽNOSTI TERAPEUTICKÉHO OVPLYVNENIA PRAVOSTRANNÉHO A ĽAVOSTRANNÉHO SRDCOVÉHO ZLYHANIA ALTERNATÍVNOU MODULÁCIOU RENÍN-ANGIOTENZÍN-ALDOSTERÓNOVÉHO SYSTÉMU U POTKANA.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1067/19-221/2

Kľúčová slová : RAAS, hypertenzia, srdcové zlyhanie

Účel projektu: základný výskum

### Cieľ projektu:

Cieľom projektu je zistiť vplyv etablovanej a inovatívnej interferencie s RAAS a ich kombinácie na orgánové poškodenie a expresiu RAAS peptidov v prípade pravostranného a ľavostranného srdcového zlyhania u potkana. Etablovaná inhibícia RAAS bude realizovaná inhibíciou ACE (lisinopril). Inovatívna interferencia bude zahŕňať permissívne pôsobenie na Ang 1-7 (ATQ). Zameriame sa na pravostranné zlyhanie srdca, s využitím modelov indukujúcich rozvoj pľúcnej hypertenzia, ako i na ľavostranné zlyhanie srdca prostredníctvom navodenia tlakového preťaženia a ischemického poškodenia myokardu. Sledovať budeme najmä morfológické poškodenie myokardu a veľkých ciev (hypertrofia a fibróza), funkčné poškodenie myokardu a koreláciu týchto zmien s koncentráciami peptidov RAAS prostredníctvom mapy RAAS, ktoré umožní posúdiť spätnoväzobné mechanizmy pri modulácii RAAS a tak poukázať na možné mechanizmy jednotlivých spôsobov modulácie RAAS a ich kombinácie. Tieto údaje môžu byť zaujímavé s ohľadom na interpretáciu výsledkov klinických štúdií, ktoré s rôznym výstupom sledovali možnosti kombinovanej inhibície RAAS. Komplexné porovnanie inovatívnej ako aj etablovanej interferencie s RAAS v kombinácii môže naznačiť možnosť doplnenia terapeutického potenciálu liečby pri závažných kardiovaskulárnych indikáciách (zlyhávanie pravého a ľavého srdca, pľúcna hypertenzia, artériová hypertenzia, hypertrofia ľavej a pravej komory).

### Očakávaný prínos projektu:

Hoci sa jedná o prácu základného výskumu, ktorej cieľom je objasniť úlohu kombinovanej intervencie založenej na inhibícii klasického a stimulácii protektívneho RAAS v ovplyvnení pravostranného a ľavostranného zlyhávania srdca, projekt môže mať aj aplikovaný prínos v naznačení možných indikačných oblastí pre liečivá v predklinickej fáze

výskumu. RAAS tvorí komplexnú kaskádu enzýmov, peptidov a ich receptorov zapojenú do regulácie krvného tlaku, sodíka, vody a trofických procesov. Objavenie nových častí RAAS, ktorých úloha bola donedávna skôr v tieni výskumu AT<sub>1</sub> receptorov, výrazne rozšírilo možnosti liečby kardiovaskulárnych ochorení a redukcii ich morbiditu a mortality. Existuje viacero indikácií, že práve nedávno objavené komponenty alternatívneho alebo tzv. protektívneho RAAS; ako Ang 1-7 a Mas receptor, by mohli zohrávať úlohu v patogenéze a potenciálne aj liečbe kardiovaskulárnych ochorení. Vlastný vedecký prínos spočíva v ukázaní účinku kombinácie etablovanej inhibície RAAS, inhibíciou ACE, prostredníctvom zníženej koncentrácie Ang II a inovatívnej interferencii vedúcej k zvýšenej koncentrácii Ang 1-7, s potenciálom stimulácie Mas receptora, pri rozvoji pravostranného zlyhania srdca v dôsledku ochorení pľúcnej cirkulácie a pri rozvoji pravostranného zlyhania srdca v dôsledku tlakového preťaženia a ischemického poškodenia myokardu.

#### Druh a počet použitých zvierat:

V experimente budú použité samce potkanov normotenzného kmeňa Wistar (W) a samce spontánne hypertenzných potkanov (*Spontaneously Hypertensive Rat* - SHR), vo veku 10 – 12 týždňov s hmotnosťou 200 – 250 g. Celkovo bude použitých 276 jedincov v dvoch etapách pokusu:

- **samce kmeňa Wistar - 240 jedincov**  
(etapa 1, fáza 1: 12 jedincov; etapa 1, fáza 2: 24 jedincov  
etapa 2: 204 jedincov)
- **samce kmeňa Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) - 36 jedincov**  
(etapa 2, fáza 3: 36 jedincov)

#### Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujmá na použité zvieratá v rámci projektu

V etape 1, fáze 1 (tab.1) je našim cieľom sledovať vplyv kombinovanej farmakologickej modulácie RAAS podávaním lisinoprilu a ATQ na zmeny koncentrácie komponentov RAAS a jej vplyv na akútne zmeny tlaku krvi. Všetky zvieratá v tejto fáze sa uvedú do celkovej inhalačnej anestézy a podrobia sa kanylácii a. carotis a v. jugularis. Kanylácia a. carotis s využitím injekčnej pumpy umožní kontinuálne infúzne podávanie testovaných látok priamo do krvného obehu, po dobu 40 minút so zvyšujúcimi sa koncentráciami v presne definovaných časových intervaloch a spoločne s kanyláciou artérie carotis umožní sledovanie akútnych zmien krvného tlaku v závislosti od dávky lisinoprilu resp. ATQ. Kanylácia a. carotis súčasne umožní odber 4-5 vzoriek arteriálnej krvi, z ktorých stanovíme zmeny koncentrácií RAAS komponentov v závislosti od zmeny koncentrácie testovaných látok. Zvieratá po tomto postupe nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené (kat. krutosti: bez možnosti zotavenia).

Tabuľka 1: Postupy etapy 1, fázy 1 a ich vplyv na experimentálne zvieratá

| základná charakteristika postupu                                                                                                                                                                                         | vplyv na zviera                                             | frekvencia a trvanie úkonu | klasifik. krutosti     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| • váženie zvierat                                                                                                                                                                                                        | krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvieratom | 1 krát denne - 1 min       | slabá                  |
| • kanylácii artérie carotis a vény jugularis s infúznym podávaním lisinoprilu alebo ATQ, <ul style="list-style-type: none"> <li>o priame meranie tlaku krvi</li> <li>o opakovaný odber krvi z kanyly (300 ul)</li> </ul> | krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvieratom | 1 krát – 40 min            | bez možnosti zotavenia |

V etape 1, fáze 2 (tab. 2) budú zvieratám intraperitoneálne implantované osmotické minipumpy (dĺžka: 5 cm, priemer: 1,4 cm a hmotnosť: 5,1 g) s definovanou koncentráciou lisinoprilu alebo ATQ (vyhodnotené na základe výsledkov získaných z etapy 1, fázy 1). Zárok vykonáme v celkovej anestéze, s využitím preemptívnej analgézie. Tento postup môže indukovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach a krátkodobé narušenie celkovej pohody a stavu (*kat. krutosti: stredná*). Pumpa funguje na základe gradientu osmotického tlaku, na činnosť nevyžaduje žiadnu formu externého napojenia a preto sa umiestňuje intraperitoneálne. Samotný proces implantácie je pomerne rýchly a nevyžaduje anestézu dlhšiu ako maximálne 10 minút. Využitie takéhoto systému podávania liečby síce zvieratá mierne zaťažuje potrebou chirurgického zákroku na úvod experimentu, no umožní kontinuálne podávanie testovaných látok až počas 28 dní. Po zotavení zvieratá zo zákroku, počas celej dĺžky experimentu, nespôsobuje zvieratú bolesť, neobmedzuje ho v príjme potravy a vody a nijako nelimituje jeho pohybovú aktivitu. Využitie osmotických minipump úplne eliminuje potrebu častej a opakovanej aplikácie látok, napríklad opakované subkutánne alebo intraperitoneálne injekcie, najmä v prípade látok s krátkym polčasom rozpadu a zníži potrebu častej manipulácie so zvieratom. 7 dní po implantácii osmotických pump budú zvieratá opäť uvedené do anestézy a podrobené kanylácii a. carotis a v. jugularis. Prostredníctvom kontinuálne infúzne podávať ATQ/lisinopril, so zvyšujúcimi sa koncentraciami v presne definovaných časových intervaloch po dobu 40 minút. Prostredníctvom kanylácie a. carotis budeme sledovať možné zmeny hodnôt krvného tlaku v závislosti od koncentrácie podávanej látky a odoberať vzorky krvi, z ktorých stanovíme zmeny koncentrácií RAAS komponentov. Zvieratá po tomto postupe nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené (*kat. krutosti: bez možnosti zotavenia*).

Tabuľka 2: Postupy etapy 1, fázy 2 a ich vplyv na experimentálne zvieratá

| základná charakteristika postupu | vplyv na zviera                                             | frekvencia a trvanie úkonu | klasifik. krutosti |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| • váženie zvierat                | krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvieratom | 1 krát denne - 1 min       | slabá              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                               |                                       |                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• intraperitoneálna implantácia osmotických púmp v celkovej anestéze</li> </ul>                                                                                                                                                                  | krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach a krátkodobé narušenie pohody a celkového stavu zvierat'a ako dôsledok chirurgického zákroku | 1 krát – iniciácia projektu<br>15 min | stredná                |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ rekonvalescencia zvierat po implantácii</li> </ul>                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                               | 4-7 dní                               | stredná                |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• kanylácii artérie carotis a vény jugularis s infúznym podávaním lisinoprilu alebo ATQ,               <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ priame meranie tlaku krvi</li> <li>◦ opakovaný odber vzorky krvi z kanyly</li> </ul> </li> </ul> | krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvierat'om                                                                                  | 1 krát – 40 min                       | bez možnosti zotavenia |

V etape 2 sa zameriame na možnosť dlhodobej ochrany voči nástupu a rozvoju pravostranného a ľavostranného srdcového zlyhania ako aj možnému zníženiu morbidít a mortality na modeloch pravostranného srdcového zlyhania, indukovaného rozvojom pľúcnej hypertenzie a na modeloch ľavostranného zlyhania srdca navodeného tlakovým preťažením a na nehypertenznom modeli ischemického poškodenia myokardu. Pravostranné srdcové zlyhanie indukujeme prostredníctvom rozvoja pľúcnej artériovej hypertenzie (PAH) podaním **a)** monokrotalínu a **b)** prostredníctvom rozvoja chronickej tromboembolickej hypertenzie aplikáciou inertných polystyrénových mikrosfér, pokrytých zmesou fibrinogénu a kolagénu. Model ľavostranného srdcového zlyhania bude navodený tlakovým preťažením u **c)** spontánne hypertenzných potkanov (SHR) v porovnaní s ich normotenznými kontrolami a **d)** chronickým orálnym podávaním N(G)-Nitro-L-arginin-metyl esteru (L-NAME) potkanom kmeňa Wistar. Model ľavostranného zlyhania srdca, navodený ischemickým poškodením myokardu bude predstavovať zlyhanie srdca **e)** indukované podaním isoproterenolu u potkanov kmeňa Wistar (W), ktorého funkčné a morfológické dôsledky sú závažnosťou podobné infarktu myokardu a simulujú priebeh chronického srdcového zlyhávania.

Všetky zvieratá z jednotlivých skupín budú podrobené postupom stručne zhrnutým v tabuľke 3. Zvieratám bude denne monitorovať telesnú hmotnosť, čo môže indukovať krátkodobý mierny stres spojený s manipuláciou so zvierat'om (*kat. krutosti: slabá*). Zvieratám zo všetkých skupín bude 1x týždenne meraný tlak krvi a srdcová frekvencia metódou „tail-cuff“ na chvostovej artérii. Meranie sa vykonáva na bdelom zvierati, ktorému je krátkodobo obmedzený pohyb po dobu približne 10 min, zviera nie je vystavené bolesti, no môže pociťovať krátkodobý stres (*kat. krutosti: slabá*). Meranie budeme vykonávať opakovane, po adaptačných meraniach 1x týždenne.

Na začiatku samotného experimentu budú zvieratám zo všetkých skupín intraperitoneálne implantované osmotické minipumpy (dĺžka: 5 cm, priemer: 1,4 cm a hmotnosť: 5,1 g), naplnené roztokom liečiv (zmes lisinoprilu a ATQ/lisinopril/bosentan/fyziologický roztok). Zárok vykonáme v celkovej anestéze, s využitím preemptívnej analgézie. Tento postup môže indukovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach a krátkodobé narušenie celkovej pohody a stavu (*kat. krutosti: stredná*).

Pumpa funguje na základe gradientu osmotického tlaku, na činnosť nevyžaduje žiadnu formu externého napojenia a preto sa umiestňuje intraperitoneálne. Samotný proces implantácie je pomerne rýchly a nevyžaduje anestézu dlhšiu ako maximálne 10 minút. Využitie takéhoto systému podávania liečby síce zvieratá mierne zaťažuje potrebou chirurgického zákroku na úvod experimentu, no umožní kontinuálne podávanie testovaných látok až počas 28 dní. Po zotavení zvieratá zo zákroku, počas celej dĺžky experimentu, nespôsobuje zvieratú bolesť, neobmedzuje ho v príjme potravy a vody a nijako nelimituje jeho pohybovú aktivitu. Využitie osmotických minipúmp úplne eliminuje potrebu častej a opakovanej aplikácie látok, napríklad opakované subkutánne alebo intraperitoneálne injekcie, najmä v prípade látok s krátkym polčasom rozpadu a zníži potrebu častej manipulácie so zvieratom. Na základe poznatkov z odbornej literatúry a overenia koncentrácií látok podávaných prostredníctvom minipumpy by tieto nemali akokoľvek narušovať celkový stav a pohodu zvierat počas celej dĺžky experimentu.

Pri zákroku, počas pôsobenie celkovej anestézie, bude v závislosti od príslušnosti do jednotlivých skupín jednorazovo subkutánne aplikovaný monokrotalín, isoproterenol alebo fyziologický roztok (*kat. krutosti: slabá*). Zvieratá v etape 2, fáze 2 podstúpia aplikáciu inertných polystyrénových mikrosfér, pokrytých zmesou fibrinogénu a kolagénu. Ich prvé podanie prebehne súčasne s implantáciou osmotických púmp. Táto metodika vyžaduje opakovanie aplikácie po 7. a 14. dňoch, vykonávané v úplnej anestéze. Tento postup môže spôsobiť krátkodobú bolesť, utrpenie alebo strach a narušiť celkovú pohodu a stav experimentálnych zvierat. Pôsobením takto podaných látok očakávame rozvoj pľúcnej hypertenzie, systémovej hypertenzie a príznakov pravostranného alebo ľavostranného zlyhania srdca (*kat. krutosti: stredná*).

Všetky zvieratá z každej experimentálnej skupiny budú najskôr 21. dní po chirurgickej implantácii osmotických púmp podrobené echokardiografickému vyšetreniu, ktoré vykonáme v celkovej anestéze s trvaním maximálne 30 minút. Toto vyšetrenie nespôsobuje bolesť a len minimálne narušuje stav a pohodu zvierat (*kat. krutosti: slabá*).

V čase ukončenia experimentu (28 dní po implantácii osmotických púmp) zvieratá uvedieme do celkovej anestézy a podrobíme katetrizácii a. carotis a a. femoralis na stanovenie vnútrokomorového tlaku krvi. Po tomto výkone už zviera nenadobudne vedomie a bude utratené v celkovej anestéze navodenej inhaláciou izofluránu s odberom krvi punkciou srdca s exsanguináciou a s následnou dekapitáciou (*kat. krutosti: bez možnosti zotavenia*).

Tabuľka 3: Postupy etapy 2 a ich vplyv na experimentálne zvieratá

| <b>základná charakteristika postupu</b>                           | <b>vplyv na zviera</b>                                                                                | <b>frekvencia a trvanie úkonu</b> | <b>klasifik. krutosti</b> |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| • váženie zvierat                                                 | krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvieratom                                           | 1 krát denne - 1 min              | slabá                     |
| • meranie krvného tlaku „tail cuff“ metódou na chvostovej artérii | krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou so zvieratom, nahrievaním na 38 °C a obmedzením pohybu | 1 krát týždenne<br>10 min         | slabá                     |

|                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                    |                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| • intraperitoneálna implantácia osmotických pŕp v celkovej anestéze                 | krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach a krátkodobé narušenie pohody a celkového stavu zvierat ako dôsledok chirurgického zákroku – vykonaný v celkovej anestéze (2,5% izofluránu v 2 L O <sub>2</sub> /min) | 1 krát – iniciácia projektu<br>10 min                                              | stredná                |
| ○ injekčná (subkutánna) aplikácia látok monkrotalín (fáza 1)/isoproterenol (fáza 5) |                                                                                                                                                                                                                        | 1 krát - súčasne s implantáciou osm. pŕp<br>< 1 min                                | slabá                  |
| ○ rekonvalescencia zvierat po implantácii                                           |                                                                                                                                                                                                                        | 4-7 dní                                                                            | stredná                |
| ○ injekčná aplikácia trombogénneho mixu do chvostovej vény (fáza 2)                 | krátkodobý stres spôsobený najmä manipuláciou pred uvedením do celkovej anestézy                                                                                                                                       | 1. krát - súčasne s implantáciou osm. pŕp<br>2. krát – 7. deň<br>3. krát – 14. deň | stredná                |
| ○ indukcia rozvoja pravostranného alebo ľavostranného srdcového zlyhávania          | rozvoj pľúcnej/systémovej hypertenzie, nehypertenzné poškodenie myokardu s progresívnou remodeláciou myokardu<br><br>prejavy dyspnoe, znížená pohybová aktivita, úbytok hmotnosti                                      | 28 dní                                                                             | stredná                |
| ○ kontinuálna orálna administrácia L-NAME v pitnej vode                             | rozvoj systémovej hypertenzie                                                                                                                                                                                          | 28 dní                                                                             | stredná                |
| • echokardiografické vyšetrenie                                                     | krátkodobý stres spôsobený najmä manipuláciou pred uvedením do celkovej anestézy (2,5% izofluránu v 2 L O <sub>2</sub> /min)                                                                                           | 1 krát – 21. deň po implantácii osm. pŕp<br><br>15 – 30 min                        | slabá                  |
| • katetrizáciou a. carotis communis, a. femoralis,                                  | krátkodobý stres spôsobený najmä manipuláciou pred uvedením do celkovej anestézy (2,5% izofluránu v 2 L O <sub>2</sub> /min)                                                                                           | 1 krát – 28. deň po implantácii osm. pŕp                                           | bez možnosti zotavenia |

#### Predpokladaná úroveň krutosti:

*Slabá:* váženie, manipulácia so zvieratami, opakované neinvazívne meranie systolického tlaku krvi, echokardiografické vyšetrenie, subkutánna injekčná aplikácia látok v celkovej anestéze

*Stredná:* intraperitoneálna implantácia osmotických pŕp, rekonvalescencia po implantácii, injekčná aplikácia trombogénneho mixu, rozvoj zlyhávania srdca.

*Bez možnosti zotavenia :* katetrizácia a. carotis communis, a. femoralis, v. jugularis a ľavej komory v terminálnej anestéze pred ukončením experimentu

### **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 **3R**.

#### **Nahradenie:**

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

#### **Redukcia počtu zvierat:**

V experimentoch 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 ku zvolenej liečbe. V experimente bude použitý minimálny počet kontrolných zvierat. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe experiment opakovať. V experimentoch sa použijú geneticky homogénne rovnaké skupiny zvierat. V 2. etape experimentu budeme sledovať vplyv testovaných látok na rozvoj zlyhávania srdca počas 28 dní od iniciácie projektu. V prípade rozvoja závažných príznakov zlyhávania srdca, indukovaného rôznymi spôsobmi (fáza 1-5), ukončíme danú časť experimentu pred 28. dňom, po usmrtení zvierat odoberieme vzorky krvi a tkanív a samotné ukončenie experimentu bude korelovať s rozvojom závažných príznakov ochorenia. Rozvoj zreteľných príznakov zlyhávania srdca očakávame v období približne od 21. dňa experimentu a preto predpokladáme pomerne nízku mortalitu zvierat pred samotným plánovaným ukončením projektu (na úrovni 5-10%).

#### **Zjemnenie:**

V experimente budeme využívať postupy, ktoré sú z hľadiska krutosti kategorizované ako slabé a stredné. Po presune z chovného zariadenia budú zvieratá v karanténne po dobu 2 týždne. Počas celej doby pobytu zvierat v zariadení bude zvieratám poskytované šetrné zaobchádzanie. Zvieratá budú umiestnené v klietkach po dvoch, aby sa zabránilo sociálnej izolácii. Zvieratám bude poskytnutý prístup k vode a krmivu *ad libitum*. Klietky budú obohatené o predmety na hranie a ohryzávanie. So zvieratami bude od momentu vstupu do karantény manipulovať prísne limitovaný počet pracovníkov, na ktoré budú postupne zvykané. Zvieratá budú umiestnené vo zverinci, kde sú zabezpečené vhodné podmienky pre držanie experimentálnych zvierat (teplota vzduchu 20-24 °C, relatívna vlhkosť 45-65 %, svetelný režim 12/12, potrava KKZ-P-/M, pitná voda *ad libitum*, vhodná podstielka) a starostlivosť o zvieratá. Pri pokuse bude zabezpečené minimalizovanie bolesti a utrpenia. Na metódu merania krvného tlaku budú zvieratá postupne adaptované.

Echokardiografické vyšetrenie je plánované u všetkých zvierat v 2. etape na 21. deň po iniciácii experimentu. V prípade zhoršenia zdravotného stavu jednotlivých zvierat, vyhodnoteného na základe *humane end-point* skóre, sa takéto jedince vyšetreniu nebudú podrobovať. Echokardiografia bude vykonávaná pracovníkom s dostatočnými skúsenosťami, tak aby sa limitovala doba, počas ktorej budú zvieratá vystavené anestéze. V priebehu vyšetrenia aj v čase zotavovania sa z anestézy budú zvieratá umiestnené na výhrevnej podložke pre zamedzenie rozvoja hypotermie.

Využitie systému osmotických minipúmp na podávanie liečby umožní kontinuálne podávanie testovaných látok až počas 28 dní, s miernym zaťažením experimentálnych zvierat potrebou chirurgického zákroku. Po zotavení zvieratá zo zákroku a počas celej dĺžky experimentu minipumpa nespôsobuje zvieratú bolesť, neobmedzuje ho v príjme potravy a vody a nijako nelimituje jeho pohybovú aktivitu. Využitie osmotických minipúmp úplne eliminuje potrebu častej a opakovanej aplikácie látok, napríklad opakované subkutánne alebo intraperitoneálne injekcie, najmä v prípade látok s krátkym polčasom rozpadu a zníži potrebu častej manipulácie so zvieratom. Po chirurgickej implantácii osmotických púmp bude zvieratám podané analgetiká. Zvieratám bude poskytnutý dostatočná doba na zotavenie sa. Výrobca osmotických púmp (ALZET Osmotic Pumps) uvádza pri peritoneálnom umiestnení možné krátkodobé narušenie príjmu potravy a prírastok telesnej hmotnosti, ktoré by však malo byť normalizované do 24 – 48 hodín po zákroku. V tomto období bude stav zvierat intenzívne kontrolovaný a vyhodnocovaný, zameriame sa najmä na sledovanie hojenia operačnej rany, motorickú aktivitu, príjem potravy a vody a prírastok telesnej hmotnosti. Bezprostredne po operačnom zákroku budú zvieratá na približne 2-6 hodín umiestnené v kletke osamote, voda i krmivo budú umiestnené na dne vanice v miskách tak aby k nim malo zviera uľahčený prístup. Po úplnej úprave celkového stavu budú zvieratá navrátené do svojej pôvodnej kletky. Stav všetkých zvierat bude ďalej monitorovaný a vyhodnocovaný na základe vopred stanoveného skóre *humane end-points*. V prípade dosiahnutia hraničných hodnôt bude stav daných zvierat bezodkladne konzultovaný s veterinárnym lekárom.

Zároveň s chirurgickou implantáciou osmotických minipúmp bude zvieratám jednorazovou subkutánnou injekciou, v závislosti od experimentálnej skupiny, podaný monokrotalín alebo isoproterenol. Zvieratám v 2. etape a fáze 2 aplikujeme zmes trombogénneho mixu intravenózne do chvostovej vény. Aplikácia trombogénneho mixu v celkovej anestéze bude zopakovaná po 7 a 14 dňoch od prvej dávky. Podanie týchto látok bude viesť k postupnej indukcii príznakov pľúcnej artériovej hypertenzie, pľúcnej tromboembolickej hypertenzie, systémovej hypertenzie alebo ischemickému poškodeniu s rozvojom pravostranného alebo ľavostranného zlyhávania srdca, prejavy ktorých môžu byť závažné. V 2. etape experimente budeme rozvoj ochorenia sledovať v limitovanom časovom rozsahu, maximálne 28 dní od implantácie osmotických púmp a podania týchto látok, počas ktorých budú zvieratá denne monitorované a ich celkový stav vyhodnocovaný na základe stanoveného skóre *humane end-points* (tab.4). Zameriame sa najmä na sledovanie respirácie – prítomnosť dyspnoe, tachypnoe, úbytok hmotnosti, znížený príjem potravy a vody, zníženú pohybovú aktivitu. V prípade dosiahnutia hraničných hodnôt, poukazujúcich na závažné poškodenie zdravotného stavu budú dané zvieratá bezodkladne utratené. Ukončenie tejto časti

projektu je plánované najneskôr v 28. deň od jeho iniciácie, respektíve jednotlivé zvieratá budú utratené v čase pozorovania rozvoja zreteľných klinických príznakov a ich stav bude vyhodnotený na základe skóre *humane end-points* ako závažný. Po usmrtení zvierat odoberieme vzorky krvi a tkanív a ukončenie experimentu bude korelovať s rozvojom takto stanovených príznakov ochorenia.

Tabuľka 4: Humane *end-points* skóre

| HODNOTENÁ KATEGÓRIA     | KLINICKÝ PREJAV                                                                                           | SKÓRE |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <i>koža a srst'</i>     | normálny vzhľad                                                                                           | 0     |
|                         | piloerekcia, lokálna strata ochlpenia                                                                     | 5     |
|                         | infekcia pooperačnej rany, kožné lézie                                                                    | 10    |
| <i>oči, nos, ústa</i>   | normálny vzhľad                                                                                           | 0     |
|                         | výtok z nosa, nečistenie sa                                                                               | 5     |
| <i>dýchanie</i>         | normálne                                                                                                  | 0     |
|                         | dyspnoe, tachypnoe                                                                                        | 5     |
|                         | dyspnoe/tachypnoe a dýchanie s otvorenými ústami, sipot                                                   | 10    |
| <i>lokomócia</i>        | normálna                                                                                                  | 0     |
|                         | znížená                                                                                                   | 5     |
|                         | úplne absentujúca                                                                                         | 10    |
|                         | abnormálne držanie tela alebo chôdza (hrbenie, nekoordinovaný pohyb, krívanie, tras alebo kľče)           | 10    |
| <i>správanie</i>        | normálne, bez počuteľnej vokalizácie                                                                      | 0     |
|                         | nepokoj, izolácia, stereotypné správanie, agresivita, nezáujem o predmety na obohatenia priestoru klieťky | 5     |
|                         | vokalizácia pri manipulácii                                                                               | 7     |
|                         | vokalizácia bez podnetu                                                                                   | 10    |
|                         | abnormálne držanie tela alebo chôdza (hrbenie, nekoordinovaný pohyb, krívanie, tras alebo kľče)           | 10    |
| <i>telesná hmotnosť</i> | normálna - prírastok hmotnosti korešpondujúci s rastovou krivkou                                          | 0     |
|                         | znížená o menej ako 5%                                                                                    | 3     |
|                         | znížená o menej ako 15%                                                                                   | 5     |
|                         | znížená o viac ako 15 %                                                                                   | 10    |

#### Celkové skóre

0-110

0 – 15

fyziológický/takmer fyziologický stav zvieratá

15 – 40

zhoršený zdravotný stav - kontrola veterinárnym lekárom a postup podľa odporúčania

> 40

závažný zdravotný stav - ukončenie experimentu pred 28. dňom trvania a bezodkladné humánne usmrtenie

PROJEKT BUDE PODLIEHAŤ OPÄTOVNÉMU SCHVAĽOVANIU: nie

## Netechnické zhrnutie projektu 1315/19-221/3

**Názov projektu:** Terapeutický efekt rôznych účinných látok a účinných látok viazaných na nanočastice na progresiu nádorových xenograftov.

**Kľúčové slová:** xenograft, prírodné látky, protilátky, chemoterapeutikum, nanomateriál

**Účel projektu:**  
Základný výskum

**Cieľ projektu:** Hlavným cieľom projektu je ozrejmiť terapeutické účinky rôznych účinných látok a účinných látok viazaných na nanomateriál rôzneho charakteru na tvorbu a rast nádorov. Používané účinné látky už boli testované *in vitro*, kde vykazovali silnú protinádorovú aktivitu.

**Prínos projektu:** Hlavným prínosom tohoto projektu, bude v prípade potvrdenia protinádorovej aktivity testovaných látok *in vivo*, možnosť využitia testovaných látok a postupov na zefektívnenie liečby nádorových ochorení. Mnohé z testovaných látok sú v súčasnosti na trhu dostupné ako liečivá alebo výživové doplnky a preto poznanie ich efektu na tumorigenézu by malo význam pri manažmente nádorových ochorení u ľudí.

**Počet a druh použitých zvierat:** Myš laboratórna (*Mus musculus*), NMRI nu/nu samice 900 ks, SCID samice, 100 ks

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

Počas tetovania, aplikácie buniek pod kožu, alebo do chvostovej žily, intraperitoneálnej aplikácie luciferínu a účinných látok a počas merania veľkosti xenograftov, prípadne váženia budú zvieratá prežívať miernu nepohodu a krátkodobý (menej ako 60sec) stres. Počas *in vivo* imaging analýzy budú zvieratá v inhalačnej anestézii umiestnené na vyhrievanej podložke v skenovacom zariadení, takže by nemali utpieť významnú ujmu.

V niektorých prípadoch bude nutné odoberať aj krv z orbitálneho sinusu alebo chvostovej žily v anestézii, alebo z *vena saphena*. Maximálne odoberaté množstvo bude 200 mikrolitrov. Krv bude odoberaná 1x týždenne, takže by nemalo dochádzať k výraznej ujme.

Xenografty, ktoré zvieratá vytvoria po jednorazovej aplikácii nádorových buniek, budú podkožné a nepresiahnu veľkosť 1 cm<sup>3</sup>. Xenografty sú najmenej invazívny, najmenej zdravie a prežívanie zvierat ovplyvňujúci typ nádoru. Xenografty sa aplikujú subkutánne, čo je pre organizmus najmenej zaťažujúca aplikácia, formujú nádor v mieste vpichu a bunky z nádoru sa nešíria do iných častí tela.

Navrhované postupy môžu vyvolať zhoršenie zdravotného stavu zvierat, najmä u kontrolných zvierat, ktoré nebudú liečené. Zhoršenie zdravotného stavu sa môže prejaviť stratou hmotnosti a/alebo sťaženým dýchaním, nechutenstvom. Zdravotný stav zvierat sa však bude denne kontrolovať. U zvierat, ktoré vyvinú nádor budeme sledovať ich správanie, či majú zhrbený postoj, zmenu výrazu tváre alebo naježenú sršť. Za human end point budeme považovať zmenu výrazu tváre podľa publikácie DJ Langford *et al.*, 2010: Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse, NATURE METHODS, VOL.7 NO. 6 JUNE 2010; doi:10.1038/nmeth.1455. Pri získaní minimálne 4 bodov v zmene výrazu tváre bude zviera usmrtené. Zvieratá sa usmrčia cervikálnou dislokáciou

v inhalačnej anestézii (Isoflurin). Usmrtenie zvierat na konci pokusu je nevyhnutné pre získanie nádorového tkaniva.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** stredná

**Súlad s požiadavkami „3R“**

**Nahradenie:**

Účinné látky, ktoré budeme v tomto projekte testovať, vykazujú vo všetkých *in vitro* testoch na bunkových kultúrach, vrátane 3D modelov nádorových sferoidov, významnú protinádorovú aktivitu. Ďalším dostupným stupňom testovania, sú hlodavce, ktoré sa v tomto štádiu nedajú nahradiť iným postupom.

**Obmedzenie:**

Z experimentov uskutočnených na bunkových kultúrach *in vitro* a z dostupnej vedeckej literatúry sme schopní určiť dávkovanie účinných látok ako aj frekvenciu dávkovania. Na testovanie na zvieratách používame len látky, ktoré vykazovali na bunkových kultúrach protinádorové účinky.

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané štatisticky vyhodnotiteľné výsledky. Ak získame štatisticky významné údaje z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

Postupy a zloženie pokusných skupín sú naplánované tak, aby bolo možné využiť jednu kontrolnú skupinu zvierat pre čo najviac testovaných látok.

**Zjemnenie:**

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prístupom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu. Prostredie, v ktorom sú zvieratá ustajnené je obohatené papierovými roľkami, papierovou vatou, prípadne paličkami na ohryzovanie. So zvieratami sa zaobchádza opatrne a citlivo.

**Spätné posúdenie projektu:**

Áno

## Príloha č. 5

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Vplyv experimentálne vyvolanej pľúcnej fibrózy na extrapulmonálne orgány (pilotná štúdia)

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1068/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov):** poškodenie pľúc, pľúcna fibróza, zápal, kardiomyopatia, hepatopatia

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

#### Informácie o cieľoch projektu:

Cieľom projektu je overiť hypotézu, že primárne poškodenie pľúc môže viesť aj k nežiaducim účinkom na činnosť extrapulmonálnych orgánov (srdca, pečene, obličiek ai.), čo môže výrazne zhoršiť prognózu pacientov. Cieľom predloženého projektu (pilotnej štúdie) je zhodnotiť mieru predpokladaného sekundárneho poškodenia pečene a srdca pri primárnom chronickom poškodení pľúc, pľúcnej fibróze. Animálny model pľúcnej fibrózy vyvoláme transorálnym intratracheálnym podaním siliky dospelým potkanom a v intervaloch stanovených podľa protokolu určíme zmeny na pľúcnom tkanive, ale aj na tkanive pečene, obličiek a srdca ako aj v krvnej plazme a porovnáme tieto zmeny s nálezmi u zdravých zvierat.

#### Predpokladaný vlastný prínos projektu:

Závažné poškodenie pľúc môže spôsobiť zápalové, apoptotické a nekrotické zmeny extra-pulmonálnych orgánov a tiež poruchu ich funkcie. Pri poškodení pľúc, ktoré môže byť samo osebe kritickým stavom, môže kardiálna, hepatálna alebo renálna insuficiencia predstavovať faktor bezprostredne ohrozujúci život. Projekt prinesie nové informácie o zmenách zápalových, pro-fibrotických, oxidačných a apoptotických markerov v pľúcnom tkanive, ale aj v tkanive srdca, obličiek a pečene v modeli pľúcnej fibrózy. V prípade potvrdenia hypotézy o negatívnom ovplyvnení extra-pulmonálnych orgánov pri tomto type poškodenia pľúc by výsledky projektu mohli predstavovať predklinickú bázu pre prípadné doplnenie protokolu liečby o kardio-, reno- a hepatoprotektíva, prípadne iné liečivá a postupy, ktoré by mohli zmierniť negatívny dopad na tieto orgány.

#### Počet a druh zvierat:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*, kmeň Wistar), samec, 64 jedincov

#### Predpokladaná ujma na zvieratách:

Model „pľúcnej fibrózy“: v celkovej inhalačnej anestéze (4% izofluran + O<sub>2</sub>) zviera umiestnime na naklonenú chirurgickú podložku, hrudník pod prednými končatinami a chvost zafixujeme k podložke adhezívnymi páskami. Transorálne pomocou pipety s

tenkou sterilnou špičkou podáme do trachey siliku (50 mg/ml v objeme 1,0 ml sterilného fyziologického roztoku). Následne zviera umiestnime do prenosného boxu na vyhrievanú podložku. Po úplnom odoznení účinkov anestézy zviera umiestnime späť do chovného boxu. Tým istým spôsobom podáme zdravej kontrolnej skupine namiesto siliky sterilný fyziologický roztok zodpovedajúceho objemu. Usmrtenie zvierat na konci postupu budeme vykonávať taktiež v celkovej inhalačnej anestéze (4% izofluran + O<sub>2</sub>), exsangvináciu pomocou punkcie ľavej komory srdca, a to po 14 dňoch od podania siliky (n=16 zdravé kontroly a n=16 zvieratá s fibrózou) (hodnotenie zápalových a včasných fibrotických zmien, časť „I“) a po 28 dňoch (n=16 zdravé kontroly a n=16 zvieratá s fibrózou) (hodnotenie neskorých fibrotických zmien, časť „II“). Počas celej realizácie postupu budú zvieratá zotrvať v priestoroch centrálného zverinca, t.j. v známom prostredí, aby sme minimalizovali stres, a budú mať prístup potravy a vody *ad libitum*.

#### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Počas postupu budú zvieratá v bdelom stave denne podrobené váženiu a kontrole zdravotného stavu a podaniu inhalačnej anestézy pre podaním siliky a pred usmrtením (stupeň krutosti „slabý“). Jednorazové transorálne intratracheálne podanie siliky/fyziologického roztoku a usmrtenie zvierat na konci postupu exsangvináciou sa budú vykonávať v celkovej anestéze (stupeň krutosti „slabý“). V súvislosti s vyvolávaním modelu „pľúcnej fibrózy“ očakávame aj možné zhoršenie ich zdravotného stavu: zvieratá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zjezenie srsti a pod. (stupeň krutosti: „stredný“).

**Klasifikácia krutosti postupov celkovo: „stredná“.**

#### **Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:**

**Nahradenie (Replacement):** Pri overovaní možných alternatívnych metód pre prípadnú náhradu navrhovaných metodických postupov sme nenašli vhodnú alternatívnu metódu k metódam používaným na prípravu modelu pľúcnej fibrózy, pomocou ktorej by bolo možné realizovať naše postupy bez použitia zvierat. Štúdium zmien po vytvorení modelov pľúcnej fibrózy sa v súčasnosti v celosvetovom meradle realizuje prevažne na myšiach a potkanoch, hoci ojedinele je možné nájsť aj práce, kde bol model pľúcnej fibrózy vyvolaný na morčatách, psoch alebo primátoch. Čiastkové výsledky by bolo možné získať aj štúdiom zmien na myšiach, táto metodika však nie je pre nás vhodná, nakoľko je technicky a prístrojovo náročnejšia, dochádza pri nej k väčšiemu úhynu zvierat a výťažnosť výsledkov z analýz tkanív (pľúc, pečene, srdca, obličiek) je neporovnateľne nižšia ako pri postupoch na potkanoch. Postupy nie je možné nahradiť ani *in vitro* metódami, ani použitím počítačových simulácií. Použitie potkanov pre vytvorenie modelu pľúcnej fibrózy je v našich podmienkach optimálnym riešením.

**Obmedzenie (Reduction):** Na získanie validných výsledkov použijeme n=16 zvierat v každej skupine (Fibróza 14 dní/Kontrola 14 dní a Fibróza 28 dní/Kontrola 28 dní), čo považujeme za najnižší možný počet tak z hľadiska reprodukovateľnosti, ako aj z hľadiska získania nevyhnutných údajov a objektívne hodnotiteľných výsledkov. Menší počet zvierat v jednotlivých skupinách by mohol zvýrazniť pôsobenie inter-individuálnych rozdielov s možnosťou spochybnenia objektívnosti výsledkov.

Celkový počet zvierat (n=16) v každej skupine rozdelíme na 2 podskupiny (n=8) podľa protokolu plánovaných vyšetrení tkanív a orgánov tak, aby sme získali pre každý typ analýzy n=8 vzoriek v jednotlivých skupinách; pľúca: bronchoalveolárna laváž polovice pľúc a analýza buniek BAL, histologické a imunohistochemické vyšetrenie tkaniva pľúc, hodnotenie reaktivity pľúc na bronchokonstrikčné mediátory (metacholín, histamín), hodnotenie pľúcneho edému (wet-dry lung weight ratio), vzorka tkaniva pre rtPCR, príprava tkanivového homogenátu na analýzy markerov zápalu, oxidačného poškodenia, apoptózy, fibrózy atď.; srdce, pečeň, obličky: histologické a imunohistochemické vyšetrenie tkaniva srdca, vzorka tkaniva pre rtPCR, príprava tkanivového homogenátu na analýzy markerov zápalu, oxidačného poškodenia, apoptózy atď.

#### **Zjemnenie (Refinement):**

Zaobchádzanie so zvieratami bude zabezpečené tak, aby boli uspokojené ich základné fyziologické potreby vrátane klimatických podmienok (teplota prostredia 20-24 °C, vlhkosť vzduchu 40-60%) a poskytnutia optimálneho množstva vhodnej potravy a tekutín *ad libitum*. Stres u zvierat budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a hryzenie. Príprava modelu „pľúcnej fibrózy“ bude prebiehať v laboratóriu v pokusnej časti centrálneho zverinca, kde sa bude realizovať inhalačná anestéza izofluranom, transorálne intratracheálne podanie siliky, priebežná kontrola zvierat počas vývoja modelu ochorenia vrátane váženia, ako aj eutanázia zvierat na konci postupu, t.j. v známom prostredí pre zvieratá, aby sa minimalizoval stres. Úkony, ktoré by mohli byť pre zviera nepríjemné alebo bolestivé, budú pritom vykonávané v celkovej inhalačnej anestéze (podanie siliky, eutanázia).

V súvislosti s vyvolávaním modelu „pľúcnej fibrózy“ očakávame aj možné zhoršenie zdravotného stavu: zvieratá môžu reagovať zmenou správania (môžu byť izolované od skupiny, menej pohyblivé, nemať záujem o okolie), môžu mať nižší príjem potravy a vody, môže sa objaviť zjezenie srsti a pod. Pri zhoršení zdravotného stavu bude zvieratám poskytnutá zvýšená starostlivosť a liečba. V prípade zhoršenia zdravotného stavu, ktoré presahuje mieru očakávaného zhoršenia stavu v súvislosti s vyvolávaným ochorením, vedúci projektu na základe výsledného *human end-point skóre* a po konzultácii s veterinárnym lekárom rozhodne o humánnom ukončení postupu eutanáziou.

**Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie**

## PRÍLOHA 2

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Cílená modulácia črevnej mikrobioty a jej transplantácia v prevencii a terapii črevných zápalových chorôb – pilotná štúdia

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1188/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov):** ulcerózna kolitída, dextran sulfát sodný, fekálna transplantácia

**Účel projektu:** základný výskum

#### Ciele projektu:

Nešpecifické črevné zápaly (inflammatory bowel disease, IBD) je skupina chronických zápalov tráviaceho traktu, ktoré majú neinfekčný pôvod a príčiny ich vzniku nie sú zatiaľ dostatočne objasnené. Jednou z foriem IBD je ulcerózna kolitída, pri ktorej je zápal lokalizovaný v oblasti hrubého čreva a konečníka, má kontinuálny charakter a zasahuje len mukóznú vrstvu črevnej steny. Terapia je v súčasnosti skôr symptomatická, v pokročilejších štádiach ochorenia je nutný chirurgický zásah. Často sa vyvíjajú závažné komplikácie, vedúce až k invalidizácii pacienta. Z toho dôvodu sa hľadajú nové možnosti prevencie a liečby IBD. Jednou z nich je transplantácia črevnej mikrobioty, pri ktorej sa do tráviaceho traktu aplikuje kompletná komunita črevných mikroorganizmov získaných od zdravých darcov. Predkladaný projekt je pilotný, jeho cieľom je nájsť optimálny spôsob indukcie chronickej kolitídy. Súčasne sa bude hľadať optimálna časová schéma aplikácie črevnej mikrobioty tak, aby sme čo najvernejšie imitovali priebeh ochorenia u pacienta a súčasne bol dosiahnutý maximálny terapeutický účinok fekálnej transplantácie. Na základe výsledkov tejto štúdie bude podaná žiadosť o schválenie postupov, v ktorých otestujeme terapiu ulceróznej kolitídy fekálnym transplantátom obohateným o špecifikované druhy baktérií resp. naturálnych látok. Ako model bude využitý konvenčný kmeň potkanov s chemicky (dextran sulfátom sodným) indukovanou kolitídou. V projekte budú stanovované morfológické (stena tráviaceho traktu), mikrobiologické, biochemické a imunologické (lokálna a systémová imunitná odpoveď) parametre.

#### Prínos z vykonaného projektu:

Pacienti s ulceróznou kolitídou často trpia závažnými včasnými i neskorými komplikáciami, ktoré významne znižujú kvalitu ich života. Z toho dôvodu sa hľadajú nové

možnosti liečby IBD. Fekálna transplantácia by mohla byť výhodným, málo invazívnym terapeutickým prístupom. Prínosom predkladaného projektu bude zavedenie modelu chronickej ulceróznej kolitídy a optimalizácia aplikácie fekálneho transplantátu tak, aby v ďalších experimentoch mohol byť testovaný účinok cielene upravenej črevnej mikrobioty. Z dlhodobého hľadiska budú výsledky slúžiť ako základ pre klinické štúdie.

#### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

laboratórne potkany, kmeň Sprague-Dawley, spolu 30 zvierat

#### Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu a predpokladaný stupeň krutosti:

| Postup                                                | Vplyv na zvieratá                                                                                                                                                                                       | Stupeň krutosti |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Váženie zvierat, handling                             | Krátkodobý slabý stres, bez bolesti.                                                                                                                                                                    | slabý           |
| Opakované injekčné i.p. podanie anestetika            | Strednodobý mierny stres. Opakovaná bolesť spôsobená vpichom ihly.                                                                                                                                      | stredný         |
| Chemická indukcia ulceróznej kolitídy – podávanie DSS | Bez bolesti, roztok DSS podávaný v pitnej vode.                                                                                                                                                         | slabý           |
| Vývin ulceróznej kolitídy                             | Na 4.-5. deň podávania DSS sa u zvierat rozvíjajú zápalové zmeny v oblasti hrubého čreva, sprevádzané výskytom hnačiek, úbytkom telesnej hmotnosti, krvácaním z tráviaceho traktu.                      | stredný - krutý |
| Fekálna transplantácia                                | Bez stresu a bolesti. Postup bude vykonávaný v ľahkej celkovej anestéze. Transplantát bude opakovane aplikovaný do lúmenu hrubého čreva použitím katétra z ohybného mäkkého materiálu, s oblou špičkou. | stredný         |
| Dekapitácia                                           | Bez stresu a bolesti. Postup vykonávaný v hlbokjej celkovej anestéze.                                                                                                                                   | slabý           |

#### Uplatňovanie zásad 3R

##### 1. Nahradenie zvierat

Nahradenie experimentálnych zvierat nie je možné vzhľadom na charakter experimentu. Vzájomnú interakciu črevného epitelu, transplantovanej črevnej mikrobioty a imunitného systému ako odpoveď organizmu na vznik kolitídy je možné skúmať len v podmienkach *in vivo*, za účasti ďalších kľúčových regulačných systémov – nervového a hormonálneho. Výhodou nami zvoleného modelu IBD oproti *in vitro* modelom alebo gnotobiotickým zvieratám je bežné mikrobiálne osídlenie čreva pokusných zvierat a prítomnosť štandardne vyvinutého imunitného systému, ktorého jednotlivé zložky sa vyvíjajú v priebehu ontogenézy v kontakte s antigénmi z prostredia.

## 2. Redukcia počtu zvierat

Počet zvierat v postupe bol zvolený tak, aby sme dosiahli validné a reprodukovateľné výsledky, ktoré je možné vyhodnotiť vhodnými štatistickými metódami. V DSS modeli ulceróznej kolitídy je nutné počítať s určitou mierou variability zápalových zmien v stene čreva, najmä v dôsledku *ad libitum* príjmu DSS v pitnej vode, preto je potrebné použiť uvedené počty zvierat. Ďalšie znížovanie počtu zvierat by ohrozilo dosiahnutie hodnoverných výsledkov projektu.

## 3. Zjemnenie

V priebehu pokusu bude utrpenie zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru. Zdravotný stav a prejavy bolesti budú denne monitorované zaškolenými a skúsenými pracovníkmi. Kolitída sa bude vyvíjať počas 2 resp. 3 cyklov, kde sa budú striedať periódy aplikácie DSS s prestávkami na regeneráciu črevnej sliznice, počas ktorých sa namiesto DSS bude podávať voda. Tento prístup je blízky priebehu ochorenia u ľudí, kde sa striedajú obdobia pokoja (remisia) s obdobiami náhleho vzplanutia (relaps). Všetkým zvieratám bude transplantovaná črevná mikrobiota, je teda možné očakávať zmiernenie priebehu kolitídy. Podávanie liečiv na zníženie bolesti zvieratám s aplikovaným DSS nie je možné z dôvodu ovplyvnenia sledovaných parametrov, čím by mohlo dôjsť k zmareniu naplnenia cieľov projektu.

Human end point projektu:

| Sledovaný ukazovateľ      | Bodové ohodnotenie |
|---------------------------|--------------------|
| Strata hmotnosti 20 %     | 4 body             |
| Riedka vodnatá stolica    | 3 body             |
| Masívne krvácanie z rekta | 3 body             |

Po dosiahnutí tohto stanoveného skóre bude zviera vyradené z projektu a humánne usmrtené predávkovaním anestetika (tiopental).

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno

do 3 mesiacov

od ukončenia projektu

Názov projektu: 1313/19-221/3

**Morfologická a funkčná analýza meningov u potkanieho modelu tauopátie**

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** meniny, lymfatický systém, patologicky modifikované proteíny

**Účel projektu:** Základný výskum

**Podrobný účel postupu:**

Centrálny nervový systém (CNS) patrí medzi imunologicky privilegované tkanivo, chránené hematoencefalickou bariérou. Parenchým CNS je obalený sériou prekrývajúcich sa membrán, ktoré sú spoločne označované ako meniny. Meniny poskytujú ďalšiu bariéru CNS, nesú rozmanitú škálu rezidentných imunitných buniek a slúžia ako kľúčové rozhranie s perifériou.

Nedávne štúdie výrazne zlepšili naše chápanie meningeálnej imunity, čo dokazuje, ako komplexný imunitný dozor ovplyvňuje funkcie CNS za fyziologických i patologických či zápalových procesov. Distribúcia a stav aktivácie meningeálnych imunitných buniek môže hlboko ovplyvniť homeostázu CNS a prispieť k neurologickým poruchám, pričom pri zachovaní ich funkčnosti, tieto bunky naopak prispievajú k ochrane CNS.

Ďalšou významnou súčasťou meningov predstavujú nedávno objavené lymfatické cievy (Aspelund et al., 2015; Louveau et al., 2015; Mesquita et al., 2018). Tieto cievy boli opísané u myší i ľudí, pričom ich presná funkcia za fyziologických a patologických okolností ostáva nejasná. Predložený projekt má za úlohu charakterizovať meningeálny lymfatický systém nie len z morfologického ale najmä tak z funkčného hľadiska.

Vzhľadom na to, že pacientov trpiacich Alzheimerovou chorobou (ACh) neustále pribúda, správne chápanie akým spôsobom je CNS chránené resp. akým spôsobom dochádza ku „klírens“ agregátov patologicky modifikovaných proteínov z CNS, je dôležité preskúmať akú úlohu zohráva v tomto procese vaskulárny systém, konkrétne lymfatické cievy. V projekte sa zameriame na analýzu lymfatického systému v zápalovom prostredí ktoré je prítomné v našom transgénnom potkaňom modeli. Po morfologickej charakterizácii lymfatických ciev u transgénnych zvierat sa zameriame na schopnosť meningeálnych lymfatických ciev odvádzať patologické agregáty (extracelulárny tau proteín) z CNS a CSF do periférie. Pre účely projektu budeme zvieratám aplikovať látky uvedené v tabuľke č.1 príloha:1, a sledovať klírens mikromolekúl ako i makromolekúl (relevantnosť k veľkosti agregovaných a neagregovaných foriem patologicky modifikovaných proteínov).

**Prínos z vykonaného projektu:**

Výskum významne prispeje k lepšiemu pochopeniu fyziologických pochodov zapojených do udržiavania homeostázy CNS a procesov prebiehajúcich za neurodegeneratívnych podmienok s ohľadom na „klírens“ patologických lézií, čo v konečnom dôsledku pomôže pri dizajne účinných stratégií v boji proti ACh.

**Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v postupe**

Cieľom projektu je charakterizovať meniny potkanov z hľadiska imunitných buniek a lymfatických ciev. Na morfológické a funkčné analýzy lymfatického systému meningov je nutné použiť živé zvieratá, nakoľko komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme nemožno nahradiť/ rekapitulovať v podmienkach *ex vivo*. Pokusy sú navrhnuté v súlade s legislatívnymi a etickými normami, ktoré sa vzťahujú na prácu s laboratórnymi zvieratami.

**Druhy a počty použitých zvierat v postupe:**

Jednotlivé skupiny a podskupiny zvierat použitých v postupe sú uvedené v tabuľke č 2 a 3. Celkovo bude použitých 100 potkanov z toho 50 transgénnych a 50 netransgénnych zvierat. Budú použité samce a samice v rovnakom pomere.

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

Zvieratá v skupine A (Tab.č.2, príloha:1) budú slúžiť ako pilotný experiment, kedy standardizujeme množstvo a spôsob podávania látok, a síce pomocou stereotaktickej aplikácie do parenchýmu mozgu alebo do cisterna magna pomocou kanylácie. Na základe zistených výsledkov budeme v nasledujúcej skupine B (Tab.č.2, príloha:1) aplikovať metódou ktorá sa osvedčí ako významnejšia z hľadiska experimentálnych dát. Prehľad plánovaných látok použitých v jednotlivých postupoch je uvedený v Tabuľke č. 3. Pred ukončením postupu bude každé zviera uvedené do hlbkej anestézie s následnou transkardiálnou perfúziou a po humánnom usmrtení (dekapitácia) im budú odobraté tkanivá: meningy, mozog, cervikálne lymfatické uzliny. Nepredpokladá sa nepriaznivý vplyv na zviera, zvieratá reagujú veľmi dobre na intracerebrálnu aplikáciu ako i na kanyláciu cisterny magna. Pooperačná bolesť je utlmená analgetikmi. Počas doby prežívania (max 5 dní od aplikácie), bude zdravotný stav zvierat pravidelne monitorovaný.

**Charakterizácia látok jednotlivých látok:**

**FITC Dextran:**

FITC-dextran Dextran(3', 6'-dihydroxy-3-oxospiro(isobenzofuran-1(3H), 9'-))

dextrán sa používa v kardiovaskulárnych, mikrocirkulačných, perfúzných, bunkových monovrstvách a výskumoch priepustnosti bunkovej membrány ako fluorescenčná zlúčenina s indikátorom toku, ktorá umožňuje meranie procesov, ako je prietok krvi, poškodenie membrán, cievna drenáž, eliminácia obličiek atď. Látka sa bežne aplikuje in vivo do zvierat.

**Tau-fluorophore:**

Proteín tau sa purifikuje pomocou FPLC, čo je v našom inštitúte dobre zavedený postup. Rekombinantný tau proteín nenesie žiadnu modifikáciu, ako napríklad hyperfosforyláciu, pozorovanú pri Alzheimerovej chorobe. Obrat tau proteínu je rýchlejší; celkové trvanie experimentu je preto krátke. Okrem toho sú fluórované konjugované proteíny široko používané ako indikátory v biologických štúdiách po celom svete. Farbivo sa ľahko eliminuje z obehu v dôsledku jeho rozpustnosti vo vodných médiách. Neočakávame preto žiadne nepriaznivé účinky.

**EB:**

Farbivo Evans blue (EB) má dlhú históriu ako biologické farbivo a diagnostické činidlo od jeho prvéhofarbenia Herbertom McLeanom Evansom v roku 1914. Vzhľadom na jeho vysokú rozpustnosť vo vode a pomalé vylučovanie, EB sa široko používa v biomedicíne, vrátane použitia pri odhade objemu krvi a vaskulárnej permeability, detekcii lymfatických uzlín a lokalizácii nádorových lézií. Nedávno boli série EB derivátov značené izotopmi PET a môžu byť použité ako terapeutické činidlá so širokým potenciálom v dôsledku ich zlepšeného polčasu v krvi a zníženého uvoľňovania. Evans blue dye (EBD) sa bežne používa vo výskume hematoencefalickej bariéry, kedy sa táto látka aplikuje in vivo do zvierat za účelom sledovania poškodenia bariéry. Látka v nízkej koncentrácii je zvieratami dobre tolerovaná.

**Reakcia zvierat na aplikované látky:**

Vo všeobecnosti neočakávame žiadne komplikácie u netransgénnych hlodavcov ani transgénnych hlodavcov FITC dextrán, Evans blue sa bežne aplikujú in vivo zvieratám bez pozorovania adverzných reakcií. Po každej aplikácii sú zvieratá sledované, hodnotí sa ich celkový stav apatia, prípadne zvýšená aktivita, ktoré by mali odznieť v priebehu pár minút.

Predpokladáme však, že ak sa vyskytne porucha lymfatickej drenáže v dôsledku prítomnosti neurofibrilárnej patológie u transgénnych zvierat, klírens farbiva môže byť predĺžený v porovnaní s netransgénnymi hlodavcami. Identifikácia tohto procesu je jedným z hlavných experimentálnych cieľov projektu.

**Manipulácia so zvieratami:**

| <b>Charakteristika postupu</b>                                   | <b>Vplyv na zviera</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Krutosť</b> |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Vázenie zvierat</b>                                           | Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou. Bolesť slabá. Trvanie 1-2 minúty.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | slabá          |
| <b>Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetík</b> | Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.                                                                                                                                                                                                                                                                             | slabá          |
| <b>Stereotaktická aplikácia v celkovej anestézii</b>             | Štandardná metóda. Nastrihnutie kože na hlave (1cm rana), vyvrtanie malého otvoru do lebky (1mm), aplikácia látky do cieľenej oblasti mozgu, zošitie rany. Po-operačná bolesť bude utlmená analgetikami. Trvanie 1-60minút. Bolesť stredná.                                                                                                                                                         | stredná        |
| <b>Kanylácia cisterna magna (KCM) v celkovej anestézii</b>       | Štandardná metóda. Zviera je v celkovej anestéze, tupou preparáciou svalov krku sa odhalí dura mater, následne sa do nej zavedie kanylá napojená na striekačku a vpraví sa látka do cistery. Po-operačná bolesť je utlmená analgetikami. Trvanie 1-30 minút. Bolesť stredná.                                                                                                                        | stredná        |
| <b>Stav zvierat počas obdobia prežívania</b>                     | Zvieratá reagujú veľmi dobre na intracerebrálnu aplikáciu. Pooperačná bolesť je tlmená analgetikmi. Bolesť slabá až stredná.<br>Zvieratá stereotaktickú aplikáciu do mozgu ako aj KCM znášajú dobre a rýchlo sa po nej zotavujú. Zvieratá sú počas doby prežívania pravidelne monitorované, pravidelne kontrolovaný zdravotný stav, a najneskor po 5 dňoch odo dňa aplikácie budú humánne usmrtené. | slabá          |
| <b>Transkardiálna perfúzia zvierat</b>                           | Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom (PBS s heparínom). Samotná perfúzia prebehne v celkovej anestézii, z ktorej sa zviera už neprebudí. Bez možnosti zotavenia.                                                                                                                                                                        | slabá          |
| <b>Celkové hodnotenie krutosti</b>                               | <b>Stredná a bez možnosti zotavenia</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>stredná</b> |

**Zohľadnenie 3R**

**Zjemnenie:** 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 sú chované v podmienkach vyhovujúcich ich fyziologickým a sociálnym potrebám. Starostlivosť o zvieratá zabezpečujú osoby, na ktoré si zvieratá zvykli. V zverinci NIÚ SAV je denne kontrolovaný a monitorovaný zdravotný stav a pohoda zvierat. Pri prejavoch zmien zdravotného stavu veterinárny lekár upovedomí vedúceho experimentu o prípadnej potrebe vyradiť zviera z experimentu a pristúpiť k humánnemu usmrteniu zvieratá.

**Invazívne zákroky (stereotaktická aplikácia, aplikácia do cisterna magna) budú vykonané v celkovej anestézii, v plánovanom mieste incízie bude primárne aplikované lokálne znecitlivenie v podobe lidokainu. Po operačnom zákroku bude zvieratám aplikované analgetikum Rimadyl.**

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

**Nahradenie:** Účelom projektu je opísať morfológiu menigeálnych imunitných buniek a meningeálneho lymfatického systému, a sledovať efektívnosť drenáže meningeálnych lymfatických ciev. Dané ciele, vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, nie je možno realizovať *ex vivo* a teda je potrebné využiť živé zvieratá.

**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 kumulatívne účinku.

**Utrpenie versus prínos**

Zvieratá v danom experimente nebudú vystavené utrpeniu, všetky aplikácie látok a odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii. Zvieratá budú humánne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pochopeniu funkcie lymfatického systému CNS, a jeho úloh v procese neurodegenerácie.

Začiatok pokusu je plánovaný na 31.6. 2019 a bude sa realizovať do 31.12. 2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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

13 15/19-22/13

## Príloha č. 2

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Terapeutický efekt rôznych účinných látok a účinných látok viazaných na nanočastice na progresiu nádorových xenograftov.

**Kľúčové slová:** xenograft, prírodné látky, protilátky, chemoterapeutikum, nanomateriál

**Účel projektu:**  
Základný výskum

**Cieľ projektu:** Hlavným cieľom projektu je ozrejmiť terapeutické účinky rôznych účinných látok a účinných látok viazaných na nanomateriál rôzneho charakteru na tvorbu a rast nádorov. Použité účinné látky už boli testované *in vitro*, kde vykazovali silnú **protinádorovú** aktivitu.

**Prínos projektu:** Hlavným prínosom tohoto projektu, bude v prípade potvrdenia **protinádorovej** aktivity testovaných látok *in vivo*, možnosť využitia testovaných látok a postupov na zefektívnenie liečby nádorových ochorení. Mnohé z testovaných látok sú v súčasnosti na trhu dostupné ako liečivá alebo výživové doplnky a preto poznanie ich efektu na tumorigenézu by malo význam pri manažmente nádorových ochorení u ľudí.

**Počet a druh použitých zvierat:** Myš laboratórna (*Mus musculus*), NMRI nu/nu samice 900 ks, SCID samice, 100 ks

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

Počas tetovania, aplikácie buniek pod kožu, alebo do chvostovej žily, intraperitoneálnej aplikácie luciferínu a účinných látok a počas merania veľkosti xenograftov, prípadne váženia budú zvieratá prežívať miernu nepohodu a krátkodobý (menej ako 60sec) stres. Počas *in vivo* imaging analýzy budú zvieratá v inhalačnej anestézii umiestnené na vyhrievanej podložke v skenovacom zariadení, takže by nemali utrpieť významnú ujmu.

V niektorých prípadoch bude nutné odoberať aj krv z orbitálneho sinusu alebo chvostovej žily v anestézii, alebo z *vena saphena*. Maximálne odoberaté množstvo bude 200 mikrolitrov. Krv bude odoberaná 1x týždenne, takže by nemalo dochádzať k výraznej ujme.

Xenografty, ktoré zvieratá vytvoria po jednorazovej aplikácii nádorových buniek, budú podkožné a nepresiahnu veľkosť 1 cm<sup>3</sup>. Xenografty sú najmenej invazívny, najmenej zdravie a prežívanie zvierat ovplyvňujúci typ nádoru. Xenografty sa aplikujú subkutánne, čo je pre organizmus najmenej zaťažujúca aplikácia, formujú nádor v mieste vpichu a bunky z nádoru sa nešíria do iných častí tela.

Navrhované postupy môžu vyvolať zhoršenie zdravotného stavu zvierat, najmä u kontrolných zvierat, ktoré nebudú liečené. Zhoršenie zdravotného stavu sa môže prejaviť stratou hmotnosti a/alebo sťaženým dýchaním, nechutenstvom. Zdravotný stav zvierat sa však bude denne kontrolovať. U zvierat, ktoré vyvinú nádor budeme sledovať ich správanie, či majú zhrbený postoj, zmenu výrazu tváre alebo naježenú srst'. Za human end point budeme považovať zmenu výrazu tváre podľa publikácie DJ Langford *et al.*, 2010: Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse, NATURE METHODS, VOL.7 NO. 6 JUNE 2010; doi:10.1038/nmeth.1455. Pri získaní minimálne 4 bodov v zmene výrazu tváre bude zviera usmrtené. Zvieratá sa usmrčia cervikálnou dislokáciou

v inhalačnej anestézii (Isoflurin). Usmrtenie zvierat na konci pokusu je nevyhnutné pre získanie nádorového tkaniva.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** stredná

**Súlad s požiadavkami „3R“**

**Nahradenie:**

Účinné látky, ktoré budeme v tomto projekte testovať, vykazujú vo všetkých *in vitro* testoch na bunkových kultúrach, vrátane 3D modelov nádorových sferoidov, významnú **protinádorovú** aktivitu. Ďalším dostupným stupňom testovania, sú hlodavce, ktoré sa v tomto štádiu nedajú nahradiť iným postupom.

**Obmedzenie:**

Z experimentov uskutočnených na bunkových kultúrach *in vitro* a z dostupnej vedeckej literatúry sme schopní určiť dávkovanie účinných látok ako aj frekvenciu dávkovania. Na testovanie na zvieratách používame len látky, ktoré vykazovali na bunkových kultúrach protinádorové účinky.

Počet zvierat v skupinách je minimalizovaný tak, aby mohli byť získané štatisticky vyhodnotiteľné výsledky. Ak získame štatisticky významné údaje z menšieho počtu zvierat, nebude potrebné použiť celkový plánovaný počet.

Postupy a zloženie pokusných skupín sú naplánované tak, aby bolo možné využiť jednu kontrolnú skupinu zvierat pre čo najviac testovaných látok.

**Zjemnenie:**

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prístupom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V prípade potreby bude vykonané humánne ukončenie postupu. Prostredie, v ktorom sú zvieratá ustajnené je obohatené papierovými rolkami, papierovou vatou, prípadne paličkami na ohryzovanie. So zvieratami sa zaobchádza opatrne a citlivo.

**Spätné posúdenie projektu:**

**Áno**

do 3 mesiacov od ukončenia projektu

## NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

**Názov projektu:** Stanovenie imonomodulačného účinku prípravku IMMODIN v krvi morčiat po indukovanej supresii látkou azathioprin.

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1316/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** morča, imunita, supresia, azathioprin, IMMODIN

**Účel projektu:** základný/translačný výskum

Správne fungovanie jednotlivých zložiek imunitného systému u ľudí je predpokladom väčšej odolnosti voči onkologickým, infekčným, alergickým a ďalším ochoreniam, ktorých počet narastá. Imunitný systém je tvorený bunkovou zložkou a veľkým počtom bunkami produkovaných mediátorov, ktoré regulujú imunitné reakcie pri každom zo spomínaných skupín ochorení špecificky. Pri poškodení niektorej zložky je narušená celková homeostáza imunitného systému, pričom táto imunologická supresia môže viesť k vzniku vážnych ochorení. Podávanie vhodného imunomodulačného prípravku môže preto významne pozitívne ovplyvniť celkový výsledok liečby pacientov, u ktorých je zistená znížená funkcia imunitného systému. Jedným z takýchto prípravkov je IMMODIN (Transfer faktor). Ide o dialyzovaný homogenát leukocytov (DHL) periférnej krvi zdravých jedincov, ktorý obsahuje nízkomolekulové látky s veľkosťou do 10 kDa.

Azathioprin je chemická látka (purínový analóg) používaná na antigénovo-nešpecifickú imunosupresiu u ľudí a to hlavne pri ochoreniach ako sú autoimúnne ochorenia a transplantácie orgánov. Jeho mechanizmus účinku na všetky proliferujúce bunky, teda aj imunitné bunky, (napr. T a B lymfocyty) je inhibícia enzýmu, ktorý je potrebný pre syntézu DNA.

### Ciele projektu:

V projekte sa budú sledovať nasledovné ciele:

- 1/ pomocou metódy prietokovej cytometrie sledovať vybrané parametre bunkovej imunity v krvi morčiat
- 2/ overiť či jednorazová dávka imunosupresívnej látky azathioprin vyvolá pokles v proporciách T lymfocytov porovnateľný s ich poklesom v rozetovom teste. Okrem toho zistiť vplyv látky na B lymfocyty, CD4 a CD8 lymfocyty.
- 3/ overiť či jednorazová dávka IMMODINU stimuluje proliferáciu T lymfocytov, a či dôjde k normalizácii aj ostatných bunkových populácií. Tento účinok potvrdiť na 6 šaržách prípravku (3 šarže pre samce, 3 šarže pre samice).

### Prínos z predpokladaného projektu:

Produkt IMMODIN je registrovaným prípravkom pre humánne použitie na úpravu funkcií imunitného systému pri mnohých ochoreniach. U pacientov bola popísaná normalizácia potlačenej bunkovej imunity, ale mechanizmus účinku závisí od typu ochorenia a patológie. Pre overenie či jednotlivé šarže prípravku upravujú bunkovú imunitu rovnakým spôsobom, je potrebné zaviesť vhodný imunosupresívny model. Navrhovaný postup vychádza z pôvodného modelu supresie azathioprinom a následnej normalizácie počtov T lymfocytov vplyvom IMMODINU aplikovanom v rozetovom teste. Výsledky projektu rozšíria vedomosti o mechanizme imunomodulačného účinku IMMODINU na

klúčové typy lymfocytov. V budúcnosti bude možné využiť postup pre účely kontroly účinnosti produktu a prípadnej registrácie v ďalších krajinách EU.

**Druhy použitých zvierat a ich počty:** Morča domáce kmeňa TRIK, 15 ks na 1 šaržu testovaného prípravku, samice (3 šarže), samce (3 šarže), spolu 90 ks

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

Perorálna aplikácia azathioprinu a subkutánna injekcia IMMODINU predstavujú pre zvieratá len mierny krátkodobý stres. Jedna dávka azathioprinu (200mg/kg) bola zvolená na základe odbornej literatúry, predklinických testov výrobcu lieku a jeho farmakokinetiky u morčiat tak, aby nevyvolala výrazné poškodenie organizmu. Látka sa v organizme nekumuluje a postupne sa vylučuje z tela von. Odber krvi kardiálnou punkciou je v intervaloch 7-7-14 dní, čo je dostatočne dlhý čas na zregenerovanie miesta vpichu v srdci. Pôsobením imunosupresíva v dávkach popísaných v tomto projekte sa neočakáva u zvierat celkové zhoršenie zdravotného stavu. Taktiež sa neočakáva pretrvávajúce riziko bolesti ani utrpenia.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** stredná

| Charakteristika postupu                              | Vplyv na zviera                                                                                                                                         | Zaradenie podľa krutosti |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Váženie zvierat                                      | Krátkodobý mierny stres                                                                                                                                 | Slabé                    |
| Krátka fixácia pri aplikácii                         | Krátkodobý mierny stres                                                                                                                                 | Slabé                    |
| Jednorázová s.c. aplikácia IMMODINU                  | Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá                                                                                                                     | Slabé                    |
| Jednorázová p.o. aplikácia Azathioprinu              | Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá, mierne podráždenie pažeráka, vyššia predispozícia na vírusové, hubové a bakteriálne infekcie vplyvom imunosupresie | slabé                    |
| Opakovaný odber krvi kardiálnou punkciou v anestézii | Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá (vyblokováná znecitlivením), potencionálne riziko zlyhania srdca po opakovanom vpichu ihly                          | stredné                  |
| Usmrtenie dislokáciou krčných stavcov v anestéze     | Krátka fixácia, bolesť vyblokováná znecitlivením                                                                                                        | slabé                    |
| Pôsobenie imunosupresíva (azathioprinu)              | Znížený počet lymfocytov, zvýšená náchylnosť na vznik infekčného ochorenia                                                                              | stredné                  |
|                                                      |                                                                                                                                                         |                          |

**Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia: Uplatňovanie zásad 3R****1. Nahradenie:**

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre štatistické vyhodnotenie výsledkov. IMMODIN je určený pre pacientov s rôznymi druhmi imunodeficientných ochorení, u ktorých sa očakáva imunoreštauračný účinok a normalizácia imunitnej odpovede. Pri overení komplexného účinku prípravku je nutná cirkulácia (lymfatická, krvná) a interakcie s mnohými zložkami imunity, čo sa nedá simulovať v podmienkach *in vitro*. Z tohto dôvodu nie je možné nahradiť pokus na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. Použitie zvierat je pri tomto humánnom prípravku stále potrebné kvôli jeho širšej aplikácii v humánnej medicíne pri obnove zdravia pacientov.

**2. Redukcia počtu zvierat:**

Používanie zvierat je stále potrebné z pohľadu testovania bezpečnosti, neškodnosti a kvality liekov. Štatistické hodnotenie validity postupu si vyžaduje reprezentatívny súbor zvierat (uvedený vyššie), ktorý už nie je možné znížiť. Ďalšie zníženie počtu zvierat by sa negatívne prejavilo na reprodukovateľnosti výsledkov a to aj v dôsledku veľkej variability imunologických parametrov u morčiat. Stanovený počet je pri outbredných zvieratách minimálny a definitívny.

**3. Zjemnenie:**

Zásada zjemnenia bude dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prejdú zvieratá procesom handlingu. V priebehu pokusu bude utrpenie zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru a zdravotný stav bude denne monitorovaný skúsenými a vyškolenými pracovníkmi. Pri odbere krvi zo srdca bude zvieratám stres zmiernený podaním analgetika Zoletil. Po podaní jednej dávky supresívnej látky sa očakáva len mierny priebeh zmien, a spôsobené potlačenie imunity neohrozuje život zvierat. Humane endpoint nastane v prípade zhoršeného zdravotného stavu zvierat, ktorý sa môže prejaviť napríklad ako zježená srst', úbytok hmotnosti o viac ako 15%, zmena správania. Uvedené zviera bude vyradené z postupu a usmrtené v celkovej anestéze dislokáciou krčných stavcov pod dohľadom zmluvného veterinárneho lekára. Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach, ktoré nevyvolávajú stres a budú im poskytnuté. Starostlivosť o zvieratá počas ustajnenia a pokusu sa bude riadiť NV č. 377/2012 a 280-001-OBP. Prevádzkový poriadok vypracovaný s ohľadom na zdravie a pohodu zvierat v zvieratníku.

**Projekt nebude spätne posúdený po skončení v súlade s § 37 bodom 2) NV 377/2012:**

## Príloha č. 2.

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Vplyv podávania entacapone na antioxidačný status a reprodukčné parametre samcov potkana

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1314/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** entacapone, antioxidant, reprodukcia

**Účel projektu:** Základný výskum

**Opísať ciele projektu:** Cieľom projektu je stanoviť vplyv krátkodobého a dlhodobého podávania entacapone, inhibítora COMT, na aktivitu antioxidačných enzýmov a na ukazovatele oxidačného stresu v organizme experimentálnych zvierat, zistiť zmeny v hladinách pohlavných hormónov a zmeny v reprodukčných parametroch samcov potkana. Na základe týchto výsledkov chceme určiť optimálnu dávku a spôsob podávania entacapone pre dosiahnutie jeho maximálneho možného kladného účinku na priebeh reprodukčného procesu.

**Prínos z vykonaného projektu:** Neplodnosť postihuje medzi 13-18% manželských párov v priemyselne rozvinutých krajinách sveta. Približne v polovici prípadov je príčina na strane muža. V posledných rokoch je za hlavnú príčinu mužskej neplodnosti považovaný oxidačný stres. Entacapone je látka používaná v humánnej medicíne pri liečbe Parkinsonovej choroby ale niekoľko prác z posledného obdobia preukázalo, že má aj antioxidačné účinky. Navrhovaný pokus by bol prvý svojho druhu na svete, keďže doteraz nik neskúmal možný kladný vplyv podávania entacapone na antioxidačný status pohlavných orgánov, počet a kvalitu spermií, ani na stimuláciu tvorby pohlavných hormónov. Získané informácie by tak mohli napomôcť pri uchovaní reprodukčného zdravia u ľudí.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:** Dospelé potkany (*Rattus norvegicus*), kmeň Sprague Dawley, 60 samcov + 240 mládat.

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

Nepredpokladáme žiadny úhyn zvierat, keďže skupiny s vysokou dávkou dostanú entacapone v maximálne prípustnej dávke pre toto liečivo. Odber krvi, intraperitoneálne aj perorálne podanie látky spôsobujú iba krátkodobý stres a nevyžadujú si podanie analgetík. Izolácia orgánov bude vykonaná až po humánnom usmrtení zvierat.

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

Postupy v experimente navrhujeme klasifikovať do kategórie krutosti **stredná**.  
Zvieratá by v ich dôsledku mali pociťovať iba krátkodobú slabú opakovanú bolesť, utrpenie alebo strach.

Váženie - slabá

Ustajnenie – slabá

Manipulácia so zvieratami pri čistení vaníc – slabá

Odber žilovej krvi kanylou z laterálnej chvostovej žily - slabá

Opakovaná i. p. aplikácia liečiv - stredná

Opakovaná p. o. aplikácia liečiv – stredná

Usmrtenie podaním letálnej dávky anestetika– slabá

### Uplatnenie zásad 3R

- **zjemnenie** – experiment je postavený tak, aby bol minimalizovaný stres alebo bolesť použitých pokusných zvierat. Zvieratám bude zabezpečená dobrá výživa, adekvátne zaobchádzanie školenými pracovníkmi a vyhovujúci životný priestor, s dennou kontrolou životných podmienok. Odber krvi, perorálna i parenterálna aplikácia riedidla alebo entacapone budú vykonané odborne spôsobilými osobami. Zvýšením frekvencie kontroly zdravotného a sledovaním zmien v správaní zvierat po aplikácii použitej látky zminimalizujeme pociť diskomfortu, resp. výraznej bolesti spojenej so zhoršením zdravotného stavu zvierat. V prípade výskytu takých príznakov, ktoré budú pretrvávajúť dlhšie ako 3 dni budú zvieratá usmrtené nadmernou dávkou anestetika s následnou cervikálnou dislokáciou. Vzhľadom na charakter použitej látky je ale možnosť negatívnych vedľajších účinkov len veľmi málo pravdepodobná. Usmrtenie zvierat bude vykonané humánnym postupom spôsobilými osobami.
- **zníženie počtu zvierat** – bude použitý iba taký počet zvierat, ktorý zabezpečí možnosť štatistického vyhodnotenia experimentu z hľadiska validity pokusu a jeho reprodukovateľnosti. Rovnako dĺžka pokusu je optimalizovaná na iba na nevyhnutne dlhú dobu.
- **nahradenie zvierat** – tento pokus sa vykoná na potkanoch, pretože je to jedno z modelových zvierat v humánnej medicíne. Plánovaný experiment nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat, pretože doterajšie poznatky o problematike neumožňujú vytvorenie adekvátneho modelu *in vitro*, ktorý by dokázal simulovať ovplyvnenie reprodukčných parametrov samcov po podaní sledovanej chemikálie. Databázy medzinárodne uznaných a overených alternatívnych metód neobsahujú takéto alternatívne metódy.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:      áno      nie