

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Behaviorálne a fyziologické indikátory welfaru hydiny*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1464/11-221/3a

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): welfare, hydina, indikátory welfaru, precízna živočíšna výroba

Účel projektu*:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

Ciele projektu sú nasledovné:

- rozšíriť naše poznanie o využití bezznačkového sledovania objektov v kombinácii s hĺbkovými senzormi resp. termografiou na monitorovanie správania hydiny
- optimalizovať a vyvinúť nové testy kognitívneho skreslenia (skreslenia úsudku, pozornosti a pamäte) ako indikátory welfaru hydiny
- identifikovať možné neurobiologické indikátory welfaru hydiny
- rozvinúť poznanie o vplyve obohatenia prostredia na správanie hydiny s dôrazom na možnosti kognitívneho obohatenia prostredia
- charakterizovať schopnosť nosníc vnímať asymetriu predmetov vo vzťahu k ozobávaniu peria
- rozvinúť poznanie o vplyve kvality osvetlenia (farby svetla) na welfare brojlerov
- identifikovať a validovať imunologické indikátory welfaru
- rozšíriť poznatky o epigenetických mechanizmoch vplyvu maternálnych hormónov vo vajci a ich dôsledkoch na behaviorálne indikátory welfaru

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

Získané poznatky budú prínosom k poznaniu afektívnych stavov hydiny, k rozvoju metód (behaviorálnych, fyziologických, imunologických) ich merania a monitorovania a k rozvoju využitia obohatenia prostredia na navodenie pozitívnych emócií u hydiny. Výsledky môžu napomôcť k riešeniu problému, ako poskytnúť nosniciam väčšie možnosti prejavu ich druhovo špecifické správanie. Taktiež môžu poskytnúť poznatky, ako ovplyvniť alebo redukovať výskyt abnormálnych foriem správania v chove hydiny.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

kura domáca (*Gallus gallus*) znáškového typu – 160 ks

kura domáca (*Gallus gallus*), brojler – 270 ks

prepelica japonská (*Coturnix japonica*) – 200 ks

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

Štúdie u hydiny preukázali, že pravidelná jemná manipulácia (handling) môže zlešiť ich rast, konverziu krmiva a produkciu vajec, zvýšiť produkciu protilátok a odolnosť voči infekcii a zredukovať mortalitu v prvom týždni veku (Graml et al. 2008). Testy v nekľetkových systémoch preukázali, že zvýšená expozícia kontaktom s ľuďmi počas dvoch týždňov 2 krát denne po 15 minút, pozostávajúca z chodenia, rozprávania, kŕmenia a dotýkania sa jednotlivých vtákov viedla k poklesu vyhýbacej vzdialenosti a nárastu podielu vtákov, ktorých sa bolo možné dotknúť a počet vtákov v blízkosti testujúcej osoby tak tiež vzrástol (Graml et al. 2008). Na základe týchto údajov usudzujeme, že opakovaná jemná manipulácia napr. pri behaviorálnych testoch nemá na zvieratá negatívny dopad.

Nie je pravdepodobné, že početné navrhované behaviorálne testy (operačné podmieňovanie v Skinnerovom boxe, testy skreslenia úsudku, pozornosti, pamäte, test sociálnej motivácie, test otvoreného poľa, test tonickej imobility, test vynorenia atď.) majú nepriaznivý vplyv na použité zvieratá. Naopak, môžu dokonca v určitom zmysle pôsobiť ako obohatenie každodennej jednotvárnej rutiny zvierat. Predovšetkým testy, ktoré obsahujú odmeňovanie (väčinou múčne červy, ako vysoko palatabilná potrava pre hydinu), môžu viesť k navodeniu pozitívnych afektívnych stavov.

Injekčná aplikácia farmák spojená s riešením niektorých cieľov, podobne ako odber krvných vzoriek môžu byť pre zvieratá mierne averzívne.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Plánované behaviorálne testy sú z hľadiska úrovne krutosti klasifikované ako slabá úroveň krutosti. Systémové podávanie vybraných látok a odber krvných vzoriek sú klasifikované ako slabá alebo stredná úroveň krutosti. Navodenie nepredikovateľného chronického mierneho stresu je klasifikované ako stredná úroveň krutosti.

Uplatňovanie zásad 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať predpisy Prevádzkového poriadku zverinca. Zvieratá budú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociálnym potrebám. Zaobchádzať s nimi budeme humánne a nebude im spôsobovaný zbytočný stres. V prípade potreby bude zvieratám okamžite poskytnutá veterinárna starostlivosť.

Redukcia: Počty zvierat sú minimalizované na minimálnu hranicu tak, aby získané údaje mali akceptovateľnú výpovednú hodnotu a bolo možné štatisticky ich vyhodnotiť. Pri niektorých navrhovaných postupoch, najmä pri pilotných pokusoch pri zavádzaní nových behaviorálnych testov je možné použiť tie isté zvieratá pri overovaní dizajnu rôznych testov a tým prispieť k uplatňovaniu zásad 3R.

Nahradenie: V relevantných databázach neboli nájdené žiadne alternatívne metódy k nami plánovaným postupom (viď Príloha 4).

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

Spätné posúdenie sa uskutoční v priebehu riešenia projektu, najneskôr vo februári 2021.

Príloha 2 projektu Problémové správanie hydiny – vplyv prítomnosti matky a definovanie individuálnych fenotypov náchylných na jeho vývin

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Problémové správanie hydiny – vplyv prítomnosti matky a definovanie individuálnych fenotypov náchylných na jeho vývin

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1464/19-221/36

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): ozobávanie peria, hydina, welfare, odchov s matkou

Účel projektu*

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

- Prispiet' k lepšiemu porozumeniu vplyvu raného vývinu na rozvoj poškodzujúceho správania hydiny a na modeli prepelice japonskej identifikovať možné vplyvy odchovu s matkou na etiológiu poškodzujúceho správania.
- Doplniť behaviorálny a fyziologický profil nosníc selektovaných na vysokú a nízku mieru výskytu ozobávania peria so zameraním na kognitívne funkcie a afektívne stavy a bližšie sa zamerať na jednotlivé fenotypy spojené s ozobávaním peria (jedince ozobávajúce perie, jedince ozobávané a neutrálne jesinece).
- Roširit' poznatky o účasti neurotransmitterových systémov v mozgu na vývine a expresii ozobávania peria nosníc.

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

Väčšina poznatkov v oblasti poškodzujúceho správania hydiny pochádza z experimentov na znáskových plemenách kury domácej (nosniciach). Informácie o poškodzujúcom správaní u iných druhov hydiny, vrátane prepelice japonskej, sú limitované. Aj vzhľadom na to, že odchov prepelíc je menej náročný a tiež ich životný cyklus je rýchlejší v porovnaní s nosnicami, je tento druh vhodným modelom pre získanie informácií o vplyve raných vývinových štádií na rozvoj a dopad nežiaducich foriem správania hydiny v dospelosti. Bližším štúdiom vplyvu materského správania na mláďatá s ohľadom na rozvoj poškodzujúceho správania sa budeme môcť zamerať na možnosti jeho redukcie.

Ďalším predpokladaným prínosom projektu bude príspevok ku charakterizovaniu individuálnych rozdielov v poškodzujúcom správaní, rôznych fenotypov nosníc a s nimi spojenými kognitívnymi a afektívnymi charakteristikami. Keďže pre ozobávanie peria je charakteristická veľká individuálna variabilita a aj v rámci línií selektovaných na vysokú a nízku úroveň ozobávania sú jedince ktoré ozobávajú, jedince ktoré sú ozobávané, ako aj takzvané neutrálne jedince, je dôležité detailnejšie charakterizovanie týchto typov fenotypov. Doplnením hodnotenia dopadu ozobávania peria na welfare nosníc pomocou behaviorálnych testov afektu je prepojenie na neurobiológiu so zameraním na dopamínergický a serotonínergický systém v mozgu. Získané výsledky napomôžu v hľadaní možností ako zmierniť negatívny dopad tohto nežiaduceho správania, ktoré by boli aplikovateľné aj v hydinárskom priemysle.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

kura domáca (*Gallus gallus*) znáškového typu – plánovaný počet použitých zvierat je maximálne 150 jedincov za celé trvanie projektu; tento počet zohľadňuje možnosť opakovania celého experimentu s novými zvieratami, prípadné úhyny a fakt, že fenotypy potrebné na testovanie tvoria iba časť populácie a pre ich vyselektovanie budeme potrebovať väčšie počiatkové množstvo zvierat

prepelica japonská (*Coturnix japonica*) znáškového typu – plánovaný počet použitých zvierat je maximálne 300 jedincov za celé trvanie projektu; tento počet zohľadňuje možnosť opakovania celého pokusu s novými zvieratami a prípadné úhyny

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

Mierny nepriaznivý vplyv na zvieratá sa predpokladá pri manipulácii s nimi v rámci prenášania z domáceho prostredia do testovacích miestností. Avšak pri opakovanej a šetrnej manipulácii predpokladáme rýchlu habituáciu zvierat na handling a experimentálne postupy. Rovnako počas tréningu na diskriminačné úlohy a testovania s ambivalentnými podnetmi sa predpokladá iba mierny diskomfort, keďže testované zviera bude izolované v daný deň testovania maximálne 30 minút. V prípade nesprávnej reakcie zvierat na negatívny podnet, budú tieto trestané spústením 5s nahrávky bieleho šumu, čo je považované za nepríjemný zvuk s mierne averzívnym charakterom. Z našich predošlých skúseností vieme, že tento zvuk v kombinácii s nezískaním odmeny je dostačujúcim stimulom na odradenie zvierat od zobania na podnety, po ktorých je aplikovaný, avšak ináč nijako negatívne neovplyvňuje správanie zvierat. Navyše počas testovania budú tiež podávané múčne červy ako odmena za správnu reakciu na prezentovaný pozitívny podnet, čo môže výrazne znížiť nepriaznivost' vplyvu izolácie počas testovania, keďže múčne červy sú považované za potenciálnu formu obohatenia prostredia a pokiaľ je možnosť, hydina prístup k nim aktívne vyhľadáva. Tento typ testovania môžeme do určitej miery považovať za formu tzv. kognitívneho obohatenia, pri ktorom zvieratá kognitívnymi interakciami s prostredím získavajú určitú kontrolu nad svojím prostredím a sú odmeňované za úspešné prispôsobenie sa.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Plánované behaviorálne testy sa klasifikujú ako postupy úrovne „slabé“. Podanie letálnej dávky anestetika za účelom získania mozgového tkaniva pre ďalšiu analýzu sa považuje za stredný stupeň krutosti.

Uplatňovanie zásad 3R

Zjemnenie: Pri manipulácii so zvieratami sa budú dodržiavať predpisy Prevádzkového poriadku zverinca. Zvieratá budú chované v podmienkach vyhovujúcich fyziologickým a sociálnym potrebám. Zaobchádzať sa s nimi bude humánne a nebude sa im spôsobovať prebytočný stres. V rámci experimentov predpokladáme rozvoj poškodzujúceho správania, ktoré pravdepodobne bude zdrojom zníženého welfaru experimentálnych zvierat. Keďže toto správanie je nosnou témou navrhovaných experimentov, nebude možné sa mu vyhnúť. Nosnice však budú viackrát denne kontrolované. Jedince, u ktorých sa bude prudké ozobávanie peria masívne vyvíjať, budú od ostatných jedincov izolované, aby nedochádzalo k poraneniam a úmrtiu zvierat v dôsledku kanibalizmu. Rovnako zvieratám, ktoré budú nadmerne exponované ozobávaniu peria a u ktorých vzniknú aj len malé rany, bude okamžite poskytnutá potrebná starostlivosť, respektíve budú od ostatných jedincov izolované. Vhodná stratégia bude zvolená na základe nasledujúcej tabuľky.

Telesná hmotnosť	Normálna	0
	Pokles telesnej hmotnosti o 5 - 10%	1
	Strata hmotnosti zjavná na pohľad	2
Celkový vzhľad	Normálny	0
	Naŕuchorené perie, poklesnuté krídla	1
	Abnormálny postoj, triaška	2
Telesný pokryv	Normálny	0
	Viditeľná strata operenia	1
	Extrémna strata operenia s poraneniami kože	2
Vylučovanie	Normálny trus	0
	Hnačka	1
	Prítomnosť krvi v truse	2
Aktivita	Normálna	0
	Menej pohyblivé, sťažený pohyb, strata rovnováhy	1
	Apatia	2
Správanie	Normálne	0
	Zmeny v správaní, znížený príjem potravy	1
	Prítomnosť poškodzujúceho správania (kanibalizmus, agresivita), nadmerná plachosť	2
	SPOLU	0 - 12

SKÓRE:

- 1 – 5 častejšia kontrola zvierat'a, zváženie doplnkovej starostlivosti
- 6 – 9 konzultácia s veterinárnym lekárom, starostlivosť podľa pokynov veterinárneho lekára, dočasné vyradenie zvierat'a z postupov
- 10 – 12 úplné vyradenie zvierat'a z postupov a použitie humánneho ukončenia postupu (humane endpoint)

Redukcia: Počty zvierat sú redukované na najmenšiu možnú hranicu pri zachovaní akceptovateľnej výpovednej hodnoty a dostatočne veľkých súborov pre štatistické vyhodnotenie.

Testy kognitívneho skreslenia vyžadujú prácu s takzvanými „naivnými“ zvieratami a pre ne nie je možné používať zvieratá, ktoré boli súčasťou iných postupov. Po ukončení testovania na kognitívne skreslenie budú tieto nosnice ďalej použité v postupoch zameraných na posudzovanie funkcie neurotransmitterových systémov v mozgu na poškodzujúce správanie, čo zníži zabráni zbytočnému navyšovaniu počtu experimentálnych zvierat.

Nahradenie: V databázach EVCAM, AltTox a NC3Rs neboli nájdené žiadne alternatívne metódy k nami plánovaným postupom (viď Príloha 4).

Projekt bude podliehať opätovnému schváleniu: ☒ áno ☐ nie

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: *Udržiavanie chovného krdľa prepelice japonskej*

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1464/19-2213a

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): prepelica japonská, chov, rozmnožovanie, vajcia

Účel projektu*: Samotné jedince z chovného krdľa nebudú subjektom experimentálnych postupov, iba ich potomstvo, t. j. označený účel sa týka využitia potomstva.

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

Vytvorenie a udržiavanie chovného krdľa prepelice japonskej (*Coturnix japonica*) s cieľom:

- produkcia násadových vajec pre odchov prepelice japonskej pre následné behaviorálne a fyziologické, resp. neurobiologické experimenty
- produkcia násadových vajec pre experimenty s prepeličou chorioalantoickou membránou ako alternatívnym *in vivo* modelom

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

Prínosom projektu bude vytvorenie kontrolovaného chovného krdľa, ktorého produkcia násadových vajec umožní uskutočnenie behaviorálnych, fyziologických a neurobiologických experimentov, ktoré budú predmetom osobitného schvaľovania.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

prepelica japonská (*Coturnix japonica*), 60 jedincov

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

Vzhľadom k tomu, že sa jedná o rozmnožovací chov bez experimentálnych zásahov, nepredpokladáme žiadne nepriaznivé vplyvy či ujmy.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Krúžkovanie, prenos medzi odchovnými vanicami, voliérami, resp. kliebkami, formovanie skupín sú manipulácie, ktoré spôsobujú krátkodobý stres a nepohodu a dajú sa zaradiť pod slabý stupeň krutosti.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Projekt rozmnožovania nemožno uskutočniť bez zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počty zvierat sú minimalizované a zároveň prispôsobené tomu, aby bolo možné z daného počtu zvierat odchovať ďalšiu generáciu bez negatívneho vplyvu príbuzenského kríženia.

3. 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)

Prepelica japonská (*Coturnix japonica*) je obľúbené modelové zviera. Jej malý vzrast a nízka telesná hmotnosť, rýchle pohlavné dospievanie, vysoká produkcia vajec, zreteľný pohlavný dimorfizmus a nízke ekonomické náklady na chov sú len niektoré z výhod tohto druhu. Zvieratá počas chovu nebudú vystavené bolesti a utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach vo voliérach na podstielke a pri obmene generácií dočasne v rozmnožovacích kliebkach kvôli kontrolovanému páreniu s cieľom zamedziť príbuzenské kríženie.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU:

Názov projektu: Imunomodulačné vlastnosti probiotických enterokokov a ich enterocínov pri antiparazitárnej obrane hostiteľa s experimentálnou trichinelózou.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1604/19-22 1/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): enterocín, *Enterococcus*, imunita, *Trichinella spiralis*, myš

Účel projektu*:

- a) translačného alebo aplikovaného výskumu s cieľom
1. zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny.
2. stanovovania, odhaľovania, usmerňovania alebo úpravy posúdenia, zistenia, regulácie alebo zmeny fyziologického stavu alebo fyziologických procesov ľudí, zvierat alebo rastlín.

Ciele projektu:

V rámci novej stratégie využitia terapeutického potenciálu bakteriocínov bude zisťovaný protektívny vplyv bakteriocín-produkujúcich kmeňov *Enterococcus* a ich enterocínov na parazitárnu infekciu *Trichinella spiralis*, zoonózu rozšírená po celom svete. Imunogénna aktivita bakteriálnych kmeňov/bakteriocínov bude sledovaná na úrovni lokálnej aj celkovej, vrodenej aj získanej imunity. Budú zistené priame a nepriame interakcie enterocínov s imunoregulačnými mechanizmami hostiteľa, stimulácia buniek imunitného systému (lymfocyty, makrofágy) a produkcia cytokínov pri indukcií a regulácii imunitnej odpovede počas parazitárnej infekcie. Bude stanovená súvislosť medzi aplikáciou baktérií/bakteriocínov, indukciou efektorov imunity a odstránením parazitov. Výstupom projektu bude kmeňovo-špecifická charakteristika imunogénnych vlastností bakteriálnych kmeňov a ich bakteriocínov ako možných kandidátov na profylaktické alebo terapeutické ovplyvnenie imunitnej odpovede hostiteľa pri trichinelóze.

Prínos z vykonaného projektu:

Biokonzervačný potenciál bakteriocínov v potravinárskom priemysle je študovaný mnoho rokov, ale antimikrobiálny potenciál bakteriocínov s využitím v terapii sa skúma v poslednej dekáde rokov. Existuje veľa štúdií o inhibičnej aktivite bakteriocínov z baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu proti rôznym vírusom. Antiparazitárny potenciál bakteriocínov nebol ešte študovaný, ale na základe našich pozitívnych výsledkov (Dvorožňáková et al., 2016; Bucková et al., 2018) pri redukcii parazitárnej infekcie *Trichinella spiralis* po aplikácii bakteriocín-produkujúcich kmeňov (celých buniek) sme vybrali dva kmene, ktorých bakteriocíny chceme otestovať z aspektu imunomodulačného aj antiparazitárneho účinku. Vzhľadom na to, že trichinelóza je dôležitá parazitárna zoonóza, je potrebné vyvinúť nové metódy na jej kontrolu. Klasická liečba zahŕňa

aplikáciu antihelmintík, ktorých účinnosť je obmedzená, a preto antiparazitárny potenciál prírodných bielkovín (napr. bakteriocíny) sa v posledných rokoch čoraz viac študuje.

Druhy použitých zvierat a ich počty:

myši BALB/c, samce/samice, 18-20 g , počet 516

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

V rámci projektu sa nepredpokladá nepriaznivý vplyv testovaných baktérií a bakteriocínov na zdravie a pohodu zvierat. Naopak, probiotické baktérie sú zdraviu prospešné, môžu úspešne znížiť patogénnosť parazita. Hlavnými mechanizmami ich účinku je zlepšenie črevnej epiteliálnej bariéry, kompetitívna eliminácia patogénov, produkcia antimikrobiálnych molekúl (bakteriocínov) a modulácia imunitného systému (Lauková a kol., *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2012; Lauková a kol., *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2018; Levkut a kol., *Research in Veterinary Science* 2012; Mareková a kol., *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2007). Priebeh parazitárnej infekcie *T. spiralis* nespôsobí zvieratám bolesť (Hurníková a Kapel, *Physiology Research* 2014, 2016).

Predpokladaná úroveň krutosti:

1. Slabá: neinvazívne podávanie bakteriálnych kmeňov, bakteriocínov a larií parazita *per os* cez sondu bez použitia anestézy, v objeme limitovanom pre veľkosť a druh zvierat (50 – 150 µl) a intraperitoneálne podávanie anestetika (Pentobarbital Spofa, 50 mg/kg.ž.h.) pred odberom krvi, rýchle usmrtenie cervikálnou dislokáciou.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat: Pre projekt boli zvolené inbredné myši kmeňa BALB/c, ktoré sú potrebné pre imunologické štúdie. Myš ako drobný cicavec je súčasťou životného cyklu parazita použitého v experimente. Imunitný systém myši je príbuzný imunitnému systému človeka. Pokus nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom, pretože predmetom štúdia je vzťah probiotický kmeň/bakteriocín – hostiteľ – parazit. Črevo hostiteľa predstavuje komplexný ekosystém, v ktorom prebiehajú interakcie medzi črevnými mikroorganizmami, imunitným systémom a patogénmi. Všetky tieto zložky sa podieľajú na udržiavaní homeostázy dôležitej pre zachovanie zdravia hostiteľa. Črevné parazity tiež ovplyvňujú mikrofóru čreva a modifikujú túto rovnováhu. Na druhej strane, črevné mikroorganizmy predstavujú relevantný faktor, ktorý výrazne ovplyvňuje patofyziológiu parazitárnej infekcie, ale aj prežívanie parazita a rozvoj parazitárnej infekcie. Preto probiotické baktérie a ich bakteriocíny môžu hrať významnú úlohu v redukcii patogenity mnohých parazitov. Na základe týchto skutočností, interakcie medzi mikroorganizmami, imunitnou odpoveďou, zápalovými procesmi a parazitom musia byť študované v jednom organizme *in vivo*.
2. Redukcia počtu zvierat: Počet zvierat žiadaných pre projekt je determinovaný počtom skupín, ktorým budú aplikované 2 bakteriálne kmene a 2 bakteriocíny. Počet zvierat v jednotlivých skupinách si vyžaduje počet odberových dní a je minimálny pre štatistické vyhodnotenie výsledkov. V odberové dni sa získajú vzorky od 3 myši z každej pokusnej skupiny, tento počet je nevyhnutný pre štatistické spracovanie výsledkov. V záujme šetriť počet zvierat boli pri opakovanej schéme zredukované parazitologické analýzy len na etapy I a III, ale vyšetrenie muselo zachovať počet vyšetrených vzoriek 3 pre výraznejšie odchýlky v počtoch parazitov a pre objektívnejšiu charakteristiku intenzity parazitárnej

infekcie relevantnej k hodnoteniu imunologických parametrov. Kontrolné vzorky v počte 3 museli byť zachované aj pri opakovaných schémach, aby boli zohľadnené technické podmienky každého odberu.

3. Zjemnenie: Bakteriálne kmene a ich bakteriocíny budú podávané myšiam denne *per os* sondou v dávke 100 a 50 µl každé ráno, tento objem zodpovedá fyziologickým pomerom myší a nenaruší pohodu zvierat, nespôsobuje zvieratám žiadne bolesti a nevyžaduje si žiadnu anestézu. Parazitárna infekcia bude realizovaná na experimentálnych zvieratách perorálne sondou a larvami *T. spiralis*. Veľkosť infekčnej dávky je 400 lariev *T. spiralis*/myš v objeme 100–150 µl podľa hustoty získanej larválnej kultúry a bude aplikovaná popoludní. Infekcia zvierat larvami parazita bude krátka a nebolestivá, larvy v pufrovacom roztoku budú aplikované sondou *per os*, čo si nevyžaduje podávať myšiam prípravky na zmiernenie bolesti. Priebeh parazitárnej infekcie nespôsobí zvieratám bolesť. Pri odbere krvi budú myši v celkovej pentobarbitálovej anestéze a následne budú usmrtené cervikálnou dislokáciou, aby mohli byť odobraté orgány –slezina, peritoneálne makrofágy, tenké črevo a svaly. Denne sa bude sledovať zdravotný stav myší a v prípade prítomnosti známok utrpenia, zhoršeného zdravotného stavu budú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

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

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU:

Názov projektu: Objasnenie vplyvu infekcie larvami pásomnice *Mesocestoides vogae* na extramedulárnu myelopoézu u myší a úlohy excrečno/sekrečných antigénov lariev.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1606/161-221/3a

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): pásomnice, imunita, myeloidné supresorické bunky, extramedulárna myelopoéza

Účel projektu*: základný výskum

Cestódy (pásomnice) tvoria významnú skupinu parazitických helmintov a larválne štádiá niekoľkých druhov sú charakteristické nádorom-podobnému rastu u cicavcov. Spôsobujú tým chronické ochorenie so závažnou patológiou. Imunoterapia bola preukázaná ako účinná alternatívna liečba ochorení, ako je napríklad rakovina a parazitárne infekcie s chronickým priebehom kde patria aj medicínsky dôležité helmintózy. Navrhnutie vhodnej liečby však vyžaduje hlboké porozumenie mechanizmov akými je regulovaná imunitná odpoveď voči jednotlivým druhom parazitov. Pre tieto ochorenia je charakteristické navodenie imunosupresie s imunitnou odpoveďou Th2 typu a postupný nástup T regulačných bunkových populácií. Expanzia nezrelých populácií supresorových buniek v kostnej dreni označovaných ako „myeloidné supresorové bunky“ (MDSC) je spojená s chronickým zápalom a ich supresívna funkcia spočíva v ich schopnosti inhibovať proliferáciu a aktiváciu T buniek (Ginderachter, 2010). MDSC sú heterogénna bunková populácia v rôznych štádiách diferenciácie, čo sa prejavuje rôznou expresiou markerov typických pre makrofágy a dendritické bunky.

Ciele projektu:

V projekte sa budú sledovať nasledovné ciele:

- 1/ objasniť úlohu infekcie larvami *M. vogae* pri vyvolaní nadmernej myelopoézy nezrelých supresorických buniek (dendritické bunky, monocyty, granulocyty) v kostnej dreni myší.
- 2/ zistiť či dochádza aj k extramedulárnej myelopoéze v mieste infekcie (peritoneálna dutina) a v slezine
- 3/ overiť, či za tento mechanizmus sú zodpovedné excrečno/ sekrečné (ES) antigény lariev, čo rozšíri poznatky o imunitnej pri parazitárnych ochoreniach.

Prínos z vykonaného projektu:

Liečba ľudí a zvierat s infekciami tkanivovými štádiami pásomníc je veľmi zdĺhavá a to aj kvôli komplikovanej patológii a potlačeniu vlastnej imunitnej obrany, k čomu prispievajú aj vedľajšie účinky liekov. Pre navrhnutie vhodných alternatívnych spôsobov prírodnými látkami je potrebné dokonale poznať mechanizmy akými reguluje parazit imunologické a fyziologické reakcie hostiteľa, ktoré mu umožňujú dlhodobé prežívanie. Nedávne výskumy poukazujú na veľký význam nezrelých myeloidných buniek, ktoré následne potláčajú funkcie T lymfocytov a menia funkcie B lymfocytov.

V projekte sa bude súčasne sledovať veľa imunologickým parametrov molekulárnymi, cytologickými a imunocytochemickými metódami s využitím prietokovej cytometrie čo významne rozšíri poznatky o mechanizmoch regulácie myelopoézy v kostnej dreni a extramedulárne v peritoneálnej dutine a slezine.

Druhy použitých zvierat a ich počty: myši kmeňa BALB/c, pohlavie: samice, samce, spolu 100 ks na 2 etapy.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania

projektu: Intraperitoneálna aplikácia lariev a BrdU sa robí zvieratám jednorázovo, čo spôsobí len krátkodobý stres bez vyvolania bolesti. Experiment v 1 etape bude trvať 28 dní a počas tohto obdobia sa vyvinie pri danej infekčnej dávke 60-65 lariev len mierna infekcia, kde predpokladáme, že výrazne neovplyvní zdravotný stav zvierat. Na základe našich mnohoročných skúseností s týmto modelom infekcia trvajúca 1 mesiac nespôsobuje žiadne známky bolesti ani zmeny v správaní zvierat. Počas projektu sa bude hodnotiť welfare zvierat a zaznamenávať Skóre pre humánny bod ukončenia. Opakované intraperitoneálne podávanie ES antigénov (spolu 12 dní) môže spôsobovať zvieratám miernu bolesť pri vpichu a mierny zápal v peritoneálnej dutine (podobne ako infekcia). V prípade že by infekcia a látky mohli spôsobiť zhoršenie zdravotného stavu, na základe každodenného hodnotenia welfare zvierat, budú do tabuľky zaznamenané hodnoty pre jednotlivé parametre a v prípade, že skóre bude dva dni za sebou 10, zviera bude humánne usmrtené. Tabuľka je uvedená v prílohe Žiadosti.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabá, stredná (opakované podávanie ES)

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Experiment na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami na bunkách a /parazitoch in vitro, pretože objasnenie komplexných imunologických mechanizmov v hostiteľovi po infekcii je možné len v podmienkach in vivo pri zachovaní všetkých fyziologických procesov. Myš BALB/c kmeňa je vhodným hostiteľom pre sledovanie imunitných reakcií pri infekciách larválnymi cestódami.

2. Redukcia počtu zvierat:

Počet zvierat v postupe bol zvolený tak, aby sme dosiahli validne a reprodukovateľné výsledky, ktoré je možné vyhodnotiť vhodnými štatistickými metódami. Pri aplikácii ES antigénov a následne BrdU je nutné počítať s určitou mierou variability v dôsledku absorpcie látok v organizme. V projekte budú použité samce a samice ovplyvnené rovnakými postupmi (5ks/skupina) čo je úplne minimálny počet pre hodnotenie. Ďalšie znižovanie počtu zvierat by ohrozilo dosiahnutie hodnoverných výsledkov projektu.

3. Zjemnenie

V priebehu pokusu bude utrpenie zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru a zdravotný stav budú denne monitorované skúsenými pracovníkmi. Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach, ktoré nevyvolávajú stres a budú im poskytnuté predmety ako otáčacie koliesko, domček na ukrytie. Po zvolenej infekčnej dávke a koncentrácii ES sa očakáva mierny priebeh ochorenia. BrdU v koncentrácii 50mg/kg živej hmotnosti nie je toxická dávka pre organizmus. Každý deň sa bude hodnotiť skóre pre humánny bod

ukončenia. V prípade, že skóre bude dva dni za sebou 10, zviera bude humánne usmrtené. V tomto prípade, bude kontaktovaný veterinárny lekár, zvieratá budú vyradené z pokusu, uvedené do celkovej anestézy v atmosfére CO₂ v komore a následne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

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

Názov projektu

Timené svetlo počas noci a jeho dôsledky na fyziologické, neuroendokrinné a behaviorálne biomarkery u potkana laboratórneho

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu 1648/19-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov)

Timené svetlo počas noci, potkan, kardiovaskulárny systém, imunitný systém, správanie

Účel projektu

Základný výskum

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

Ciele projektu

- Analyzovať krátkodobé (2 týždne) a dlhodobé (5 týždňov) pôsobenie nízkej intenzity osvetlenia (2 lux) počas tmavej fázy dňa na zmeny vybraných fyziologických premenných a správania u dospelých normotenzných a spontánne hypertenzných potkanov
- Analyzovať akútne pôsobenie nízkej intenzity osvetlenia počas tmavej fázy dňa na zmeny cirkadiálneho profilu vybraných imunitných, metabolických a kardiovaskulárnych parametrov.
- Analyzovať zmeny adrenergetickej a cholinergickej inervácie kardiovaskulárneho systému u telemetricky meraných WT a SHR po krátkodobej (2 týždne) a dlhodobej (5 týždňov) expozícii nízkej intenzite osvetlenia počas tmavej fázy dňa.
- Analyzovať dôsledky expozície nízkej intenzite osvetlenia počas tmavej fázy dňa na reaktivitu imunitného systému
- Analyzovať dôsledky dlhodobej expozície nízkej intenzite osvetlenia počas tmavej fázy dňa a jej vplyv na zmenu lipidové a glukózového metabolizmu u normotenzných a hereditárnych hypertriglyceridemických potkanov.
- Analyzovať interakciu systémových zmien (cirkadiálny vs. imunitný vs. kardiovaskulárny vs. autonómny nervový systém) u potkanov vystavených ako krátkodobej tak aj dlhodobej expozícii tlmenému svetlu s nízkou intenzitou počas tmavej fázy dňa

- Analyzovať zmeny v správaní experimentálnych zvierat exponovaných ako krátkodobej tak aj dlhodobej expozícii nízkej intenzite osvetlenia počas tmavej fázy dňa

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

Ukazuje sa, že pod vplyvom nočného osvetlenia dochádza k narušeniu cirkadiánnych rytmov viacerých hormónov a autonómneho nervového systému, ktoré sa podieľajú na regulácii kardiovaskulárneho a imunitného systému. Zatiaľ existuje iba jediná štúdia realizovaná v Japonsku na kohorte starších ľudí, ktorá ukázala, že expozícia umelému svetlu v noci zvyšuje kardiovaskulárnu morbiditu. Zatiaľ však chýbajú štúdie, ktoré by osvetľovali podmieňujúce fyziologické mechanizmy.

Cirkadiánnu rytmicitu vykazujú rôzne aspekty imunitných funkcií, vrátane kinetiky imunitných buniek, prezentácie antigénu, produkcie cytokínov, ako aj ďalších funkčných vlastností. Zmeny v cirkadiánnom systéme sa môžu cez pôsobenie humorálnych faktorov a vegetatívneho systému manifestovať na fyziologických systémoch a správaní. Okrem toho, funkčnosť fyziologických systémov je prepojená navzájom a to aj ako cez metabolické deje, tak aj cirkulujúce bunky imunitného systému. Preto zmeny v imunitnom systéme a metabolizme môžu predstavovať spoločný faktor podmieňujúci negatívne dôsledky disrupcie cirkadiánnych rytmov vplyvom umelého svetla v noci na celkový zdravotný stav organizmu.

Okrem fyziologických zmien, cirkadiánnu disrupcia je spájaná so zmenami správania, ako aj chorobnými stavmi, najmä s depresiou, bipolárnou poruchou a sezónne vyvolanými chorobami. Animálne štúdie potvrdzujú, že tlmené svetlo v noci môže indukovať depresiu podobné správanie, pričom najsilnejšie účinky má modré svetlo.

Očakávame, že expozícia umelému tlmenému osvetleniu s nízkou intenzitou spôsobí zmeny v cirkadiánnom systéme, ktoré sa budú manifestovať na fyziologických systémoch, a to ako cez systémové nervové a humorálne, tak aj cez lokálne mechanizmy. Predpokladáme tiež rozdielnú odpoveď na krátkodobé a dlhodobé expozície tlmenému svetlu, ktoré by v kombinácii s rozvinutými ochoreniami (hypertenzia, SHR model; poruchy metabolizmu – diabetes a zápal, Lewis potkany; hypertriglyceridémia – hereditárne hypertriglyceridemické potkany) mali byť ešte výraznejšie.

Na podporu našich hypotéz, u zvierat plánujeme citlivé bezkontaktné kontinuálne merania hlavných fyziologických (teplota tela, tlak krvi, frekvencia srdca) a behaviorálnych (pohybová aktivita) premenných, tak aj cytologické a molekulárne hodnotenie vybraných molekúl významne zapojených v regulácii kardiovaskulárnej, imunitnej a behaviorálnej odpovede.

Porozumenie kauzálnych súvislostí a priamych fyziologických a behaviorálnych efektov umelého nočného osvetlenia môže pomôcť pri definovaní intenzity pouličného osvetlenia ale aj nastavení individuálnych domácností. To by v konečnom dôsledku mohlo prispieť k zníženiu morbidity systémových ochorení v dôsledku zmien vonkajších podmienok prostredia.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty

Sumárne v jednotlivých etapách plánujeme použiť celkovo 209 potkanov kmeňa Wistar, 121 spontánne hypertenzných potkanov, 56 imunodeficientných Lewis potkanov a 32 hereditárne hypertriglyceridemických potkanov.

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

Nepriaznivý vplyv na zvieratá by mohla mať operácia, umelý spánok počas implantácie telemetrického zariadenia alebo odberu krvi. Podľa našich praktických skúseností sa potkany po operácii zotavujú pomerne rýchlo. Už niekoľko minút po odznení účinkov anestézie sú zvieratá schopné samostatného pohybu, čo je prejavom dobrého znášania anestézie ako aj zákrokov samotných.

V dôsledku obmedzenia avšak nie úplného zamedzenia pohybu, nepriaznivý vplyv (stres) na zvieratá môže mať 30-minútový pobyt v imobilizačnej komôrke. Aby sme minimalizovali mieru ujmy (stresu), imobilizačná komôrka bude priehľadná, perforovaná, plastová, jej veľkosť bude prispôbená veľkosti zvieraťa a zviera spolu s komôrkou bude vložené do domovskej kletky.

Metabolické kletky predstavujú čiastočné obmedzenie pohybu. V nami vykonávaných experimentoch budú zvieratá v metabolických kletkách maximálne 24 hodín, čo podľa klasifikácie predstavuje slabú úroveň krutosti. Ako na úrovni fyziológie, tak ani správania, neočakávame zásadné zmeny u zvierat po 24-h pobyte v metabolickej kletke. Zvieratá nebudú dávané do metabolických kliebok opakovane.

Pri realizácii behaviorálnych testov nepočítame s výraznejšou ujmou u použitých zvierat, nakoľko testy budú krátkodobé a neinvazívne.

Nepriaznivý dôsledok na fyziologické regulácie, zdravotný stav a správanie má aj dlhodobé osvetlenie. To, do akej miery aj veľmi nízke osvetlenie počas noci ovplyvňuje fyziologické regulácie, zdravotný stav a správanie je predmetom výskumu plánovaného projektu.

Predpokladaná úroveň krutosti

Implantácia telemetrického snímača a odbery krvi budú vykonávané v celkovej anestézii, po ktorej zviera nadobudne vedomie, a preto sa klasifikujú ako „stredné“. Do kategórie „stredné“ patrí podávanie farmák (atropín, propranolol, fenylefrín a noradrenalin), imobilizačný test a test núteného plávania. Do kategórie „slabé“ spadajú, z hľadiska krutosti, test vyvýšeného bludiska v tvare plus, test otvoreného poľa a pobyt v metabolických kletkách.

Príloha 2 - Netechnické zhrnutie projektu podľa §40, Z. z. 377/2012

Typ	Úroveň krutosti	Odôvodnenie
Operácia	stredná	Použitie anestézie a analgetík
Aplikácia farmák	stredná	Subkutánne, intraperitoneálne (100-200 µl) a intravenózne (10-50 µl)
Odber krvi z chvostovej vény	stredná	Použitie anestézie a analgetík. Aby sme minimalizovali stres, potkany budú počas odberu pod izofluránovou anestéziou.
Imobilizačná komôrka	stredná	Štandardný test používaný na hodnotenie reaktivity kardiovaskulárneho systému na stresovú záťaž. Dĺžka trvania testu je 30 minút.
Test núteného plávania	stredná	Ide o štandardizované testy používané na získanie informácií o sledovaných formách správania, v ktorých sú zvieratá vystavené iba krátkodobému strádaniu
Test vyvýšeného bludiska v tvare plus	slabá	Ide o štandardizovaný test používaný na získanie informácií o správaní podobnom úzkosti, počas ktorého sú zvieratá vystavené iba krátkodobému strádaniu
Test otvoreného poľa	slabá	Ide o štandardizovaný test používaný na získanie informácií o vybraných formách vrodeneho správania (explorácii, motorickej aktivite), správaní podobnom úzkosti a učebných schopnostiach (habituácii predstavujúcej najjednoduchšiu formu učenia), počas ktorého sú zvieratá vystavené iba krátkodobému strádaniu
Pobyt v metabolických kliebkach	slabé	Krátkodobé obmedzenie pohybu. Maximálna dĺžka trvania pobytu v metabolickej kletke je 24 hodín.

b) preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat (Replacement; Zdôvodnenie použitia zvierat v projekte, zdôvodnenie prečo sa nemôže použiť alternatívna metóda bez použitia zvierat)

Nakoľko je experiment zameraný na sledovanie ako lokálnych tkanivových, tak aj systémových zmien a interakcie medzi cirkadiánnym, kardiovaskulárnym, imunitným a autonómnym nervovým systémom, pokus nie je možné realizovať na bunkových kultúrach, ktoré tieto komplexné regulačné systémy nemajú.

Taktiež alternatívna náhrada modelu potkana nižšími stavovcami nie je možná. V odbornej biomedicínskej literatúre, ktorá sa venuje problematike metabolizmu, kardiovaskulárneho, imunitného a autonómneho nervového systému je potkan štandardným a akceptovaným modelom a to aj v kontexte extrapolácie nameraných údajov na človeka.

Nakoľko sa o vplyve nízkej intenzity svetla počas tmy na spomínaní fyziologické systémy vie pomerne málo, neexistujú ani vhodné matematické modely, ktoré by spoľahlivo popísali fyziologické a behaviorálne zmeny v živých organizmoch. Absolútne vynechanie zvierat v experimente preto nie je žiadúce. Predpokladáme však, že nazberané údaje po publikovaní budú v budúcnosti slúžiť aj na vytvorenie spoľahlivých a ucelených matematických modelov.

Pri výskume nami prezentovaného charakteru nie je možné ani absolútne a ani čiastočné nahradenie zvolenej skupiny/druhu laboratórneho zvierat'a. Nemožno ho realizovať ani na bunkových kultúrach a ani za využitia počítačovej simulácie. Taktiež v ňom nemožno použiť iný, systematicky nižšie postavený druh zvierat'a.

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

Celý projekt je zameraný na nahradzovanie a obmedzenie počtu zvierat v experimentoch. Telemetrické monitorovanie umožňuje kontinuálne sledovanie vybraných kardiovaskulárnych premenných a pohybovej aktivity u toho istého zvierat'a. Tým sa počet zvierat, v porovnaní s použitím len histologických a molekulárnych metód, významne redukuje. Navyše, telemetrické meranie umožňuje pri snímacej frekvencii 2000 Hz nazberať až 10^8 údajov / 24 hodín.

Príloha č.2
Netechnické zhrnutie projektu

1424/19-221/3

Názov projektu:

Nácvik mikrochirurgickej cievnej anastomózy.

Kľúčové slová: mikrochirurgia, cievna anastomóza, replantácia, potkan

Účel projektu:

Vysokoškolské vzdelávanie alebo odborné vzdelávanie na účely získania, udržania alebo zlepšenia zručností potrebných na výkon povolania.

Ciele projektu:

V *in vivo* podmienkach za použitia laboratórnych potkanov nácvik cievnych anastomóz vykonávaných pri zväčšení operačného poľa pomocou operačného mikroskopu.

Prínos z vykonaného projektu:

Projektom sa zabezpečí získanie, udržanie a zlepšovanie chirurgických zručností potrebných pre výkon mikrochirurgie a replantačnej chirurgie.

Druh a počet použitých zvierat:

Dospelé potkany (*Rattus norvegicus*) – s vekom vyšším ako 5 mesiacov a váhou 400-500g; 100 ks

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

Operačný zákrok prebieha v celkovej anestézii, je preto bezbolestný. Na konci pokusu sú zvieratá usmrtené predávkovaním anestetikom.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy v projekte navrhujeme klasifikovať do kategórie „bez možnosti zotavenia“.

Spätné posúdenie projektu: nie

Uplatňovanie zásad 3R (replacement, reduction, refinement):

Zásada nahraditeľnosti:

Neexistuje vhodný umelý model simulujúci reálne podmienky pre mikrochirurgickú anastomózu ciev s priemerom 0,5 až 2 mm. Obdobne, aj podmienky na zvieracom alebo ľudskom kadaveróznom preparáte sú odlišné. Zošívanie ciev na laboratórnom potkanovi je z hľadiska nácviku mikrochirurgie nezastupiteľný (preparácia reálnych tkanív, vykonávanie anastomóz na cievach s cirkulujúcim krvným obehom pomocou mikroinštrumentária a operačného mikroskopu). Lekári vykonávajúci projekt budú už disponovať základnými zručnosťami s mikrochirurgických výkonmi dosiahnutými na neživých modeloch. Tie však nepostačujú na efektívne a bezpečné vykonávanie mikrochirurgie u ľudí.

Zásada zníženia:

Zníženie počtu pokusných zvierat je možné dosiahnuť optimálnym využitím každého laboratórneho potkana - na jednom potkanovi sa bude realizovať väčší počet cievnych mikroanastomóz. Dĺžka projektu je optimalizovaná na iba nevyhnutne dlhú dobu.

V projekte sa prednostne využijú zvieratá z vlastného chovu, ktoré nie sú vhodné pre iné projekty (napr. staré zvieratá, vyradené zvieratá z iných projektov, rezervné a nadpočetné zvieratá z iných projektov schválených ŠVPS SR. Tým sa redukuje nutnosť rozmnožovania zvierat pre daný projekt.

Zásada zjemnenia:

Projekt je postavený tak, aby bol minimalizovaný stres alebo bolesť použitých laboratórnych zvierat. Zvieratám bude zabezpečená dobrá výživa, adekvátne zaobchádzanie školenými pracovníkmi a vyhovujúci životný priestor s dennou kontrolou životných podmienok. Operačný zákrok bude prebiehať v celkovej anestézii, bude preto bezbolestný. Na konci pokusu budú zvieratá usmrtené predávkovaním anestetika spôsobilými osobami.

Spätné posúdenie: nie

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: 2096/19-221

Vytvorenie bunkového modelu bariéry krv-mozgovomiešny mok

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): mozgovomiešna bariéra, bunkový model, patologické proteíny

Účel projektu: Základný výskum

Podrobný účel postupu:

Bariéra medzi mozgomiechovým mokom a krvou (BCSFB) je selektívna bariéra tvorená epitelovými bunkami choroidného plexu (CP). Spolu s mozgovo-cievnu bariérou je CP nevyhnutný na ochranu centrálného nervového systému pred látkami, ktoré cirkulujú v krvnom obehú ako sú zápalové molekuly, patogény a toxíny. Polarizované epiteliálne bunky CP vykonávajú funkcie, ako je transport iónov a živín, sekréciu proteínových produktov a ochrana pred napadnutím mikroorganizmami. Hlavnou funkciou CP je produkcia a sekrécia cerebrospinálneho moku (CSF). Jedná sa o tekutinu bohatú na živiny, ktorá obklopuje mozgové tkanivo, vyplňa mozgové komory a komory miechy v subarachnoidálnom priestore. CSF sa pohybuje tokom poháňaným arteriálnou pulzáciou a dýchaním, cez komorový systém. CSF plní množstvo dôležitých funkcií v CNS, poskytuje mechanickú podporu mozgu, pomáha pri odstraňovaní vedľajších produktov metabolismu a synaptickej aktivity. Zloženie CSF je prísne kontrolované. CP je schopný regulovať homeostázu zloženia CSF (aminokyseliny, vitamíny, minerály, ióny, proteíny) reguláciou pohybu základných iónov a molekúl a metabolitov z/do CSF. CP má tiež funkciu biochemickej bariéry, pretože vylučuje toxické molekuly a lieky z priestoru CNS.

Zvieratá v predkladanom projekte budú použité na prípravu primárnych bunkových kultúr, ktoré následne budú slúžiť na zhotovenie bunkových modelov. Vytvorený bunkový model bude použitý pre štúdium testovania prechodu látok cez BCSFB a stanovenia základných farmakokinetických parametrov testovaných látok. Na základe uvedených parametrov bude možné charakterizovať mechanizmus transportu týchto látok cez BCSFB.

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

Opodstatnenosť pokusu a použitie zvierat v pokuse

Cieľom projektu je vytvorenie bunkového modelu BCSFB pre potreby štúdia mechanizmu prechodu patologických proteínov cez bunky CP. Aby bolo možné v podmienkach *in vitro* študovať mechanizmus transportu látok, proteínov, či krátkych peptidov medzi krvou a cerebrospinálnou tekutinou je potrebné vytvoriť vhodný bunkový model.

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

Druhy a počty použitých zvierat v pokuse:

Pre účely projektu sa bude pripúšťať 20 samíc/ mesačne, samičky sa budú používať opakovane, preto celkovo použijeme 120 samíc + 10 samcov na pripúšťanie.

V pravidelných týždňových intervaloch bude použitých 20 6-10 týždňových zvierat. Počet zvierat zohľadňuje potrebu pravidelnej prípravy viacerých bunkových kultúr. Celkovo bude použitých 960 myší (samcov).

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

Zvieratám nebude počas experimentu aplikovaná žiadna látka. Zvieratá budú uvedené do hlbkej anestézie (intraperitoneálnou aplikáciou anestetik), transkardiálne perfundované s následným odberom mozgového tkaniva na prípravu kultúr.

Manipulácia so zvieratami:

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Cyklus pripúšťania	1x mesačne sa budú pripúšťať samice na účely projektu. Cyklus samičiek sa bude hodnotiť na základe stupňa opuchu a začervenania pošvy externým pozorovaním. Samice v štádiu proestra vložíme do klietok ku samcom a na druhý deň ráno sa zhodnotí prítomnosť vaginálnej zátky, ktorá deteguje priebeh oplodnenia. Prirodzené pripúšťanie	slabá
Krátkodobá fixácia a intraperitoneálna injekcia anestetik	Štandardná metóda. Krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a obmedzením pohybu. Bolesť slabá. Trvanie 30 sekúnd.	slabá
Transkardiálna perfúzia	Štandardná metóda. Zviera sa v celkovej anestézii transkardiálne perfunduje štandardným roztokom (PBS) s následným odberom mozgového tkaniva. Prebehne v celkovej anestézii, z ktorej sa zviera už neprebudí. Bolesť stredná	stredná
Celkové hodnotenie krutosti štúdie		stredná

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 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.

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

Nahradenie: Vzhľadom na komplexnosť dejov odohrávajúcich sa v organizme, je potrebné vytvorenie funkčného bunkového modelu, ktorý bude pozostávať z primárnych bunkových kultúr a bude schopný vytvoriť čo najpresnejší obraz situácie odohrávajúcej sa v mozgu. Vytvorený bunkový model bude použitý pre štúdium testovania prechodu látok cez BCSFB a stanovenia základných farmakokinetických parametrov testovaných látok..

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 odbery tkanív sa uskutočnia v hlbokoj anestézii. Zvieratá budú humanne usmrtené. Výsledky získané z plánovaného experimentu môžu významne napomôcť pochopeniu patologických procesov v CNS.

Začiatok pokusu je plánovaný na 4.7. 2019 a bude sa realizovať do 31.6. 2020.

Zvieratá nebudú vystavené opätovnému použitiu.

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