

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU - 3514/19-221/3

Názov projektu: Stanovenie maximálne tolerovateľnej dávky (MTD) látok IMP1 a IMP2

Kľúčové slová v projekte:

maximálne tolerovaná dávka (MTD)

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Ciele projektu:

Cieľom projektu je získať informácie o akútnej toxicite látok IMP1 a IMP2 stanovením maximálne tolerovanej dávky (MTD). Testované látky sú bio-kompatibilné polyméry založené na polyglycerole a sú vyvíjané ako nosiče pre liečivá.

Prínos z vykonaného projektu:

Výsledky stanovenia MTD testovaných látok umožnia stanoviť toxicitu testovaných látok a uľahčia vykonávanie ďalších štúdií v nasledujúcich fázach výskumu testovaných látok.

Druhy použitých zvierat a ich počty:

Potkan Wistar 42 samíc / 2 testované látky (21 samíc/1 testovaná látka). Pokus sa vykoná len na samiciach, ktoré sú považované za citlivejšie pohlavie

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

MTD je definovaná ako dávka, ktorá nespôsobí smrť, vážne príznaky toxicity a max. 10% redukcii telesnej hmotnosti. Na stanovenie MTD sa používa metóda eskalácie dávky v logaritmickom merítku. Dávka sa zvyšuje, až kým sa zaznamenajú klinické príznaky. Eskalácia dávok je daná progresným faktorom.

Štúdia prebieha v dvoch častiach:

1/ Pred-štúdia

Účelom je vybrať vhodné dávky pre hlavnú štúdiu. Jedno zviera je aplikované vybranou počiatočnou dávkou (podľa dostupných informácií o testovanej látke). Potrebné množstvo látky bude podané zvieraťu intravenózne. Zviera je pozorované po podaní látky periodicky v priebehu prvých 4 hodín a potom priebežne 48 hodín. Podľa reakcie na podanú dávku sa nasledujúca dávka zvýši, až kým nie sú pozorované zreteľné – stredne silné príznaky toxicity. Vtedy sa eskalácia zastaví a vyberú sa dávky pre hlavný test.

Sleduje sa neschopnosť prijímať potravu alebo vodu, abnormálna vokalizácia, abnormálna pozícia alebo pohyby, rýchla strata hmotnosti, alopecia, hnačka, opuchnuté končatiny, paralýza alebo iné centrálné alebo periférne nervové poruchy – kŕče, ťažkosti s dýchaním, kašeľ, kýchanie, výtok z nosa, krvácanie, anémia. Pri hodnotení zdravotného stavu použijeme tabuľku „human end point“.

Pri hodnotení príznakov nesmieme prekročiť skóre 2 (stredne silný príznak). V prípade, že dávka spôsobí silný príznak (skóre 3), zviera bude humánne utratené a do hlavného testu sa použije dávka nižšia.

Predpokladaná mortalita je 0 %, keďže z definície MTD vyplýva, že nesmie dôjsť k úhynu zvierat. Zvyšovanie koncentrácie testovaných látok bude postupné a bude sa prihliadať na zdravotný stav zvierat, aby sa dosiahli podmienky na určenie MTD. Strata hmotnosti 10% bude v tomto prípade považovaná za stredne silný príznak (skóre 2) a nebudeme pokračovať v pred-teste.

Human end point

	Prejav	Skóre			
		0	1	2	3
1	Akýkoľvek stav vedúci k dlhotrvajúcej alebo nezvratnej neschopnosti prijímať potravu alebo vodu (napr. dlhodobá nehybnosť, obštrukciu ústnej dutiny, chýbajúce alebo abnormálne zuby...)	0	1	2	3
2	Choroby, alebo stavy, ktoré poukazujú na silnú bolesť, strach alebo utrpenie (napr. zlomeniny, autoindukovaná trauma, abnormálna vokalizácia, abnormálna pozícia alebo pohyby, otvorené rany alebo vrede ...)	0	1	2	3
3	Rýchla alebo pretrvávajúca strata hmotnosti (napr. 20%, alebo väčšia telesná hmotnosť v priebehu niekoľkých dní, alebo postupná, ale pokračujúca strata hmotnosti ...)	0	1	2	3
4	Zovšeobecnené zníženie starostlivosti a abnormálny vzhľad počas dlhého časového obdobia (napr. rozsiahla alopecia, dlhotrvajúca hnačka, opuchnuté končatiny, paralýza alebo iné centrálné alebo periférne nervové poruchy – kŕče ...)	0	1	2	3
5	Ťažké, alebo pretrvávajúce ťažkosti s dýchaním (napr. kašeľ, kýchanie, výtok z nosa ...)	0	1	2	3
6	Krvácanie, anémia	0	1	2	3

Hodnotenie

0- bez príznakov

1- mierny príznak

2- stredne silný príznak / konzultácia s veterinárnym lekárom

3- silný príznak /eutanázia

Σ príznakov > 7 eutanázia

2/ Hlavný test

Na stanovenie MTD sa vyberú 3 – 4 dávky z pred-štúdie a každá dávka sa podá jednorazovo, maximálne 5 zvieratám.

Spektrum biologických odpovedí:

bez odpovedi (NOAEL) → adaptívna fyziologická odpoveď (NOAEL) → minimálna odpoveď (LOEL) → mierna odpoveď (LOAEL) → zreteľné (stredne silné) príznaky toxicity (FEL)

Pozorovanie minimálnych, miernych alebo *zreteľných* príznakov aspoň v jednej dávkovej hladine umožňuje stanovenie MTD, ktoré sa určí z rozsahu dávok LOEL a FEL.

Klinické pozorovanie

Zvieratá budú pozorované individuálne, hneď po aplikácii, po ½, 1, 2 a 4 hodinách a potom priebežne 48 hodín. Doba pozorovania nie je daná rigidne, v prípade potreby môže byť predĺžená (max. 14 dní).

Oblasti pozorovania

Koža a srst', oči, mukózy, respiračný systém, cirkulačný systém, CNS, somatomotorická aktivita a správanie (tremor, kŕče, slinenie, diarhoea, letargia, spánok, kóma).

V hlavnom teste budú použité dávky, ktoré boli overené v pred-štúdiu a tak nie je predpoklad, že v hlavnej štúdiu sa u zvierat vyskytnú nepriaznivé príznaky zdravotného stavu, ktoré by mohli viesť k utrpeniu zvierat, prípadne až smrti. Ak by sa predsa takáto situácia vyskytla, pristúpime k human end point a zviera bude humánne utratené.

Hmotnosť zvierat

Individuálne hmotnosti zvierat budú zaznamenané krátko pred aplikáciou a potom denne.

Patológia

U všetkých zvierat bude vykonaná pitva s makroskopickým vyšetrením. Detailná pitva bude zahŕňať pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých otvorov a dutín (lebečná, hrudná a brušná) a ich obsah. Patologické nálezy budú zaznamenané pre každé zviera do protokolov.

Úroveň krutosti:

Stanovenie MTD patrí medzi stredne kruté metódy.

Hodnotenie jednotlivých postupov je uvedené v Tabuľke.

Charakteristika postupu	Vplyv na zviera	Zaradenie podľa krutosti
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabá
Značenie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabá
Jednorazová i.v. aplikácia testovanej látky	Obmedzenie približne na 1 min., mierny stres, bolesť slabá	slabá
Opakovaná i.v. aplikácia testovanej látky v pred-štúdiu	Obmedzenie približne na 1 min., mierny stres, bolesť slabá	stredná
Možná systémová reakcia	slabá až stredná bolesť	slabá - stredná
Celková doba pozorovania	48 hodín - maximálne 14 dní	slabá
Usmrtenie cervikálnou dislokáciou	Krátkodobý mierny stres	slabá
Celkové hodnotenie krutosti skúšky: slabá - stredná		

Uplatňovanie zásad 3R

V projekte budú zohľadňované zásady 3R.

Refinement – v pokuse nebudú vykonané bolestivé zákroky pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť. Slabá - stredná bolesť môže byť spôsobená systémovou reakciou na podanú látku. Po podaní testovanej látky bude zvieratám venovaná pozornosť. Počas celej štúdie budú mať zvieratá prostredie obohatené nádobami, ktoré budú slúžiť zvieratám ako úkryt. Tieto sú inertné, bezpečné, dobre udržiavateľné a nehrozí ich poškodenie ani zo strany zvierat.

Zvyšovanie koncentrácie testovaných látok bude postupné a bude sa prihliadať na zdravotný stav zvierat, tak aby sa dosiahli podmienky na určenie MTD. Ak by napriek predpokladu došlo k zhoršeniu zdravotného stavu pristúpime k „human end point“.

Reduction – počty zvierat v pokuse sú primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu; pokus sa vykoná len na samiciach, ktoré sú považované za citlivejšie pohlavie

Replacement – Možnosť náhrady testami *in vitro*

Test štúdie toxicity na zvieratách sa nedá nahradiť alternatívnymi metódami *in vitro* z dôvodu potreby reakcie živého organizmu na podanie látky a jeho systémové pôsobenie.

Spätné posúdenie projektu

Keďže pokus je hodnotený ako slabý až stredne krutý, nie je potrebné spätné posúdenie projektu.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Neurobiologické mechanizmy zodpovedné za fenotyp mánie pri bipolárnej poruche

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3566/19-221/3

Kľúčové slová v projekte:

depresia, mánia, stres, glutamátergický systém, in vivo elektrofyziológia, správanie

Účel projektu:

základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu:

Bipolárna porucha je závažná psychiatrická porucha charakterizovaná striedaním mánie, hypománie, depresie a zmiešaných afektívnych stavov. V predkladanom projekte budeme skúmať neurobiologické mechanizmy zodpovedné za fenotyp mánie. Dôraz bude kladený predovšetkým na úlohu glutamátergickej transmisie v prefrontálnej kôre a dráhe prefrontálna kôra-striatum-laterálna habenula. Na tento účel sa budú využívať dva špeciálne animálne modely, a to knockout potkany pre serotonínový transportér (5-HTT KO) a dopamínový transportér (DAT KO). Tieto potkany vykazujú protikladné behaviorálne symptómy, čo umožní odкрыť rozdiely v neurobiologickom podklade depresívneho a manického fenotypu. Cieľom projektu je prostredníctvom *in vivo* elektrofyziológie zistiť ako stimulácia prefrontálnej kôry ovplyvňuje neuronálny „firing“ v habenule.

Prínos z vykonaného projektu:

Jedná sa o základný výskum, ktorý môže byť následne využitý v klinickej praxi. Projekt poskytne prostredníctvom integrácie elektrofyziológických, neurochemických a behaviorálnych prístupov dôkaz o existencii glutamátergických mechanizmov, ktoré môžu byť podkladom mánie. Rozšírenie poznatkov o neurobiologickom podklade prešmyku z depresie do mánie prispeje k novým možnostiam farmakoterapie bipolárnej poruchy.

Počet a druh použitých zvierat:

V projekte bude použitých 280 jedincov potkana *Rattus norvegicus* na obdobie 3 rokov. Použité budú samce a samice 5-HTT KO a ich WT, DAT KO a ich WT ako aj Wistar potkany vo veku 4-7 týždňov.

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

Zvieratá až do začatia experimentálneho postupu nebudú vystavené žiadnym nepriaznivým vplyvom. Pred *in vivo* elektrofyziológickým meraním budú zvieratá uvedené do celkovej anestézie. Po ukončení meraní budú usmrtené podaním nadmerného množstva anestetika. V oboch experimentálnych štúdiách budú zvieratá testované v odlišných behaviorálnych

paradigmách. Testy môžu u zvierat vyvolať krátkodobú úzkosť a stres, nakoľko sú vykonávané v arénach s istým stupňom averzívnosti (nové prostredie, otvorený priestor, jemné osvetlenie). V prípade testu sacharózovej preferencie, ktorá nebude obnášať depriváciu vody a prenos zvieratá do novej kletky neočakávame vyvolanie nepriaznivého stavu v podobe smädu, alebo inej ujmy. Každé zviera bude vystavené iba dvom behaviorálnym testom na zabránenie kumulatívneho stresu. V 2. experimentálnej štúdii bude časť zvierat (8 jedincov /skupina) vystavená stresovému podnetu, na zhodnotenie neuroendokrinnej odpovede počas stresovej záťaže. Ako stresový podnet bude použitý model obmedzenia pohybu zvieratá v trvaní 2 hodín, ktorý predstavuje prevažne psychický stresový podnet, pri ktorom sa zvieratá umiestnia do špeciálnych priehľadných hypokinetických kletiek v tvare valca, ktoré znemožnia pohyb zvieratá, ale nespôsobia bolesť. Zvieratá budú po tomto podnete dekapitované súčasne s kontrolnými jedincami.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Podľa prílohy č.4 k nariadeniu vlády Slovenskej republiky č.377/2012 Z.z. klasifikujeme krutosť jednotlivých postupov nasledovne:

Postup	Pilotná štúdia (počet zvierat 10)	Krutosť postupov v 1. exp. štúdii (počet zvierat 110)	Krutosť postupov v 2. exp.štúdii (počet zvierat 160)
Váženie	Slabá	Slabá	Slabá
Test otvoreného poľa	-	Slabá	-
Test vyvýšeného plus. bludiska	-	Slabá	-
i.p. aplikácia anestetika	Slabá	Slabá	-
In vivo elektrofyziológia	Bez možnosti zotavenia	Bez možnosti zotavenia	-
Test sacharózovej preferencie	-	-	Slabá
Test sociability	-	-	Slabá
Model obmedzenia pohybu	-	-	Stredná (pre 80 potkanov)
Celková klasifikácia	Slabá	Slabá	Stredná

Uplatňovanie zásad “3R”:

Nahradenie zvierat:

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume bipolárnej poruchy, je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahradiiteľné. V projekte budú sledované komplexné behaviorálne ukazovatele, preto je nevyhnutné pracovať s potkanom laboratórnym.

Redukcia počtu zvierat:

V postupoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že optimalizujeme počet meraní a maximalizujeme počet odobraných vzoriek na sledovanie behaviorálnych, fyziologických, a biochemických parametrov. Znižovanie počtov by ovplyvnilo validitu dosiahnutých výsledkov.

Zjemnenie:

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Hodinu pred behaviorálnym testovaním budú zvieratá preložené do testovacej miestnosti na aklimatizáciu na nové prostredie. Každé zviera bude vystavené iba dvom behaviorálnym testom na zabránenie kumulatívneho stresu. Elektrofyziologické merania budú prebiehať v celkovej anestézii, aby nedochádzalo k zbytočnému utrpeniu, spôsobovaniu bolesti alebo zbytočného stresu, po skončení meraní budú usmrtené. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. V priebehu postupov bude všetkým zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. V prípade prekročenia skóre humane endpoints, po dohode s veterinárnym lekárom, budú choré zvieratá z pokusu vyradené a humánne usmrtené letálnou dávkou anestetika.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno ☒nie

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Neurogenéza a cirkadiánnny rytmus

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3693/19 - 221, 3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): nové neuróny, spev, mozog, správanie

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:

- Popísať efektivitu značkovačov a cirkadiánnny rytmus neurogenézy spevavcov
- Zistiť, či existuje vzťah medzi intenzitou neurogenézy a variabilitou spevu u rôznych druhov spevavcov

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

Štúdium mechanizmov neurogenézy a tiež liečebných postupov vedúcich k zlepšeniu neuronálnej obnovy po poškodení mozgu bolo a je venované intenzívne úsilie vedcov. Faktorom ovplyvňujúcim neurogenézu sa zdá byť aj cirkadiánnny rytmus, t.j. časovač s približne 24 h periódou, ktorý ovplyvňuje rôzne fyziologické procesy. V projekte popíšeme cirkadiánnny rytmus neurogenézy u spevavcov. Tie sú vhodnou alternatívou a doplnkovým modelom ku laboratórnym hlodavcom. Spevavce zdieľajú s človekom viacero znakov, vrátane migrácie nových neurónov alebo učenia sa vokalizovať (spev vtákov, reč človeka). Prínosom tejto práce bude poznanie amplitúdy a periódy cirkadiánnneho rytmu neurogenézy u tejto skupiny živočíchov a bližšia charakterizácia účinnosti látok používajúcich sa pre označenie novovznikajúcich buniek. Nové neuróny by mohli spôsobovať rôznorodosť v správaní, čo však bolo popísané len u veľmi limitovaného počtu druhov. V tejto štúdii zistíme, či má intenzita neurogenézy súvis so správaním u väčšieho počtu druhov, čím by sme potvrdili, že sa jedná o všeobecnú vlastnosť v živočíšnej ríši.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebríčka červenezobá (*Taeniopygia guttata*), 101

ryžovník sivý (*Lonchura oryzivora*), 20

astrilda vlnkovaná (*Estrilda astrild*), 20

amandava bodkovaná (*Amandava amandava*), 20

mniška muškátová (*Lonchura punctulata*), 20

batilda trstinová (*Neochmia ruficauda*), 20

mniška striebrozobka (*Euodice malabarica*), 20

pestúnka japonská (*Lonchura striata* var. *domestica*), 9

kanárik divý (*Serinus canaria*), 24

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

Mesačná izolácia vo zvukotesných boxoch by mohla mať nepriaznivý vplyv na psychiku.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Zvieratá budú vážené, odoberaná im bude krv, značkovače neurogenézy budú podávané do prsného svalu. Vo zvukotesných boxoch budú zvieratá najviac mesiac. Usmrtené budú letálnou dávkou anestetika alebo dekapitáciou. Tieto postupy sa klasifikujú ako „slabo kruté“, „stredne kruté“ alebo „bez možnosti zotavenia“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Keďže pokus je primárne zameraný na sledovanie tvorby neurónov a porovnanie tvorby a včleňovania nových neurónov do mozgových oblastí v súvislosti so správaním, nie je možné realizovať pokus na bunkových kultúrach. Alternatívne nahradenie vtáčieho modelu nižšími stavovcami alebo cicavcami tiež nie je možné, nakoľko tieto skupiny nemajú schopnosť naučenej vokálnej komunikácie.

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 na najmenšiu možnú hranicu, aby mali získané údaje akceptovateľnú výpovednú hodnotu a aby bolo možné ich štatisticky vyhodnotiť.

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)

Zebrička červenozobá a aj pestúnka japonská sú v posledných rokoch výhodné pri štúdiu naučenej vokálnej komunikácie kvôli veľkosti, rýchlemu dospievaniu a rozmnožovaniu v zajatí, typu naučenej piesne, a tiež kvôli tomu, že sú u nich výborne popísané mozgové okruhy kontrolujúce spev. Ich použitie v experimentoch je preto jasnou výhodou v porovnaní s použitím

iných druhov učiach sa vokálne komunikovať, ako sú veľryby alebo papagáje (hlodavce túto schopnosť nemajú). Ostatné použité druhy spevavcov sa vyskytujú vo fyziologických a etologických štúdiách, sú dostupné pre kúpu a vhodné pre držanie v zajatí. Ich veľkosť je tiež podobná. Preto ich považujeme za vhodné pre naše experimenty. Zjemnenie počas samotného pokusu bude spočívať v obohatení prostredia, kde zvieratá budú mať k dispozícii biele a hračky. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach. Pred transkardiálnou perfúziou bude zvieratám podaná letálna dávka izofluránu, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najnižšiu možnú mieru.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

podľa § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.

C693/19-221/3

Názov projektu:

BIOMARKERY PATOMECHANIZMOV V STARNUTÍ A SPREVÁDZAJÚCICH OCHORENIACH

Kľúčové slová: starnutie, biomarkery, patomechanizmus, metabolický syndróm

Účel projektu: Základný výskum

V súčasnosti čelí svetová populácia fenoménu predlžovania dĺžky života, ktorý je spojený najmä s rozvojom modernej spoločnosti, ale aj s pokrokom v liečbe mnohých patológií. Podľa odhadov Svetovej zdravotníckej organizácie v roku 2050 počet ľudí starších ako 60 rokov presiahne 20 % svetovej populácie [WHO. *World Report on Ageing and Health. World Heal. Organ.* 1–246 (2015)]. Na druhej strane starnutie samé o sebe je rizikovým faktorom pre rozvoj ochorení ako sú rakovina, neurodegeneratívne a metabolické ochorenia. Hoci sa v posledných dekádach problému starnutia intenzívne venuje farmakologický výskum, toxikológia starnutia je stále dosť podceňovaná. Predpokladá sa, že fyziologické starnutie je významne determinované vplyvmi prostredia. Tieto environmentálne faktory, ktoré urýchľujú proces molekulárneho starnutia boli jednotne označené ako 'gerontogény' [Sorrentino, Trends Mol Med, 2014].

a) Ciele projektu

V našom projekte sa zameriame na profilovanie sérových glykánov v zvieracom modeli epigeneticky programovanej metabolickej poruchy ako aj sledovanie zmien glykoprofilu vplyvom celulárnej senescencie v *in vitro* podmienkach. Zameriame sa tiež na štúdium molekulových mechanizmov ochranného účinku perspektívnych látok. Tieto budú v modeli *in vivo* skúmané aj z hľadiska modulácie depresívnej poruchy častej u pacientov s MetS. Projekt môže vygenerovať nové poznatky, ktoré poslúžia ako k poznaniu mechanizmov v metabolických ochoreniach spojených s vekom a v samotnom starnutí, tak aj k vývoju nových glykobiomarkerov. Projekt je vysoko aktuálny, rozvíja menej známe oblasti toxikológie (horméza, gerontogény), má multidisciplinárny a integračný charakter, spája expertov z odborov biochémie, bunková biológia, bunková farmakológia, neurofarmakológia, toxikológia, glyko-biológia, molekulárna biológia, analytická chémia so špecializáciou na štruktúrnú analýzu glykánov.

- Na *in vivo* úrovni vyhodnotíme vplyv parentálnej vysokotukovej diéty (pHFD) na vývoj kardiometabolických parametrov a celkové prežívanie potomstva (prvá generácia, F1), a zároveň vyhodnotíme profilovanie sérových glykánov.
- Na *in vivo* úrovni vyhodnotíme vplyv parentálnej HFD na vývoj behaviorálnych porúch, zmeny biochemických a molekulárnych parametrov mozgu v F1 generácii.

Počet a druh použitých zvierat

Potkany kmeňa Sprague Dawley

60 samíc, 30 samcov, 480 mlád'at (ak porodí 40 samíc a budú mať priemerne 12 mlád'at)

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávaného postupu

Počas postupu sa bude so zvieratami zaobchádzať šertne v súlade so zásadami 3R s minimálnou ujmu počas vystavenia vysokotukovej diéte. Upravená strava nevyvoláva u zvierat diskomfort. Celkový zdravotný stav potkanov bude sledovaný podľa kritérií human end points, aby sa zabránilo bolesti a utrpeniu zvierat. Odber krvi z retroorbitálneho plexu v zoletil/xylazínovej narkóze nespôsobuje zvieratám ujmu, po prebratí sa z narkózy môžu zvieratá pociťovať mierny diskomfort, avšak z praxe vieme, že veľmi rýchlo regenerujú. V predchádzajúcich postupoch s vysokotukovou diétou počas 8 týždňov neboli zaznamenané žiadne komplikácie, ujma alebo úhyn zvierat. Pri behaviorálnych testoch sa bude postupovať podľa zaužívaných protokolov. FST môže mať miernu újmu, nakoľko potkany nebudú mať možnosť uniknúť z valca napusteného vodou, avšak tento test bude jednorazový a budeme sa snažiť obnoviť komfort zvierat hneď po teste.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná

- Handling potkanov 10 min/5 ks-vanica/deň, t.j. navykanie zvierat na manipuláciu pred meraním tlaku krvi, potkany dobre znášajú handling - slabá krutosť
- Váženie zvierat 1x do týždňa, potkany dobre znášajú váženie - slabá krutosť
- Neinvazívne meranie tlaku krvi, potkany dobre znášajú manipuláciu pri neinvazívnom meraní tlaku krvi manžetou na chvoste - slabá krutosť
- Odber krvi z retroorbitálneho plexu v anestézii (zoletil 25mg/kg + xylazín 16 mg/kg živej hmotnosti), potkany po prebratí z narkózy môžu pociťovať miernu bolesť po odbere krvi a budú pozorované aj na nasledujúci deň po odbere - stredná krutosť
- Vysokotuková diéta sa považuje za slabá krutosť
- Prežívanie (možné komplikácie s obezitou) – stredná krutosť

Behaviorálne testy:

Test motorickej aktivity a explorácie v otvorenom poli – slabá krutosť

Učenie aktívnym vyhýbaním – stredná krutosť

Porsoltov test núteného plávania – stredná krutosť

Test preferencie sacharózy – slabá krutosť

Bludisko v tvare Y – slabá krutosť

Morrisovo vodné bludisko (MWM) – stredná krutosť

b) Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia (3R)

Nahradenie (Replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná vedecky akceptovateľná alternatívna metóda na štúdium dyslipidémie, hypertenzie, zmenenej tepovej frekvencie, hyperglykémie a vplyvu na kognitívne schopnosti, ktorá by nahradila klasický *in vivo* prístup na zvieratách. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako *in vitro* pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť distribúciu génovej expresie ani aktivitu enzýmov. Rovnako nie je možné zhodnotiť komplexné deje akými sú poruchy činnosti srdca, ciev a mozgu v dôsledku metabolického syndrómu na vyššie uvedené parametre nie je možné dosiahnuť bez použitia zvierat a testovania na celistvom organizme.

Obmedzenie (Reduction)

Na dosiahnutie cieľov projektu sa plánuje použiť najnižší možný počet zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Preto je potrebné v experimentoch použiť v jednotlivých skupinách 10 ks zvierat. Počas plánovaného obdobia sa za 4 roky predpokladá použitie **60 samíc, 30 samcov, 480 mlád'at** (ak porodí 40 samíc a budú mať priemerne 12 mlád'at) potkanov.

Zjemnenie (Refinement)

Starostlivosti o zvieratá ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom pracovníkov zodpovedných za projekt. Pri všetkých postupoch sa bude manipulovať so zvieratami ohľaduplne, pred meraním tlaku krvi budú niekoľko dní vopred handlované aby kľudne znášali neinvazívne meranie, pri behaviorálnych testoch sa budeme snažiť obnoviť komfort zvierat hneď ako bude možné. V prípade vodných testov (vodné bludisko, Porsoltov test) po ukončení testu budú zvieratá jemne osušené bavlnenou handrou a dané pod infračervenú lampu a nakoniec vložené do domovskej klieťky. V prípade zhoršenia zdravotného stavu sa potkany v postupe humánne usmrtia predčasne ak by vykazovali príznaky ochorenia uvedené v human endpoints, aby sa zabránilo ich utrpeniu a bolesti.

Postupy používané pri odberoch krvi majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú vykonávané skúseným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Budú vykonané opatrenia – handling zvierat na zníženie stresu pri meraní krvného tlaku neinvazívnou tail-cuff metódou. Diéta je pre potkany chuťovo prijateľná. Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody, klieťky budú obohatené o plastové tunely umožňujúce preliezanie a hru. Počas celého postupu sa so zvieratami manipuluje jemne, aby nepociťovali strach alebo bolesť. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu by sa potkanom podalo napr. registrované analgetikum Novasul (500mg/ml; max. 0,1 ml/ 450g potkan),

Nevyžaduje sa spätné posúdenie projektu.



**ŠTÁTNÁ VETERINÁRNA A POTRAVINOVÁ SPRÁVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY
Botanická 17, 842 13 Bratislava**

Č.k. Ro-3852/19-221/3

V Bratislave dňa: 25.11.2019

ROZHODNUTIE

Štátna veterinárna a potravinová správa SR ako orgán štátnej správy vo veterinárnej oblasti na základe § 6 ods. 2 písm. i) bod 2 zákona č. 39/2007 Z. z. o veterinárnej starostlivosti v znení neskorších predpisov a nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké alebo vzdelávacie účely (ďalej len „nariadenie vlády“) a vyhlášky MPRV SR č. 436/2012 Z. z., ktorou sa ustanovujú podrobnosti na ochranu zvierat používaných na vedecké alebo vzdelávacie účely (ďalej len „vyhláška“) a podľa § 46 zákona č. 71/1967 Zb. o správnom konaní v znení neskorších predpisov

s c h v a ľ u j e

žiadateľovi: **Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Malá Hora 10701/4A, 03601 Martin**

pre zariadenie : **Ústav lekárskej biofyziky UK JLF v Martine, Malá Hora 4, 036 01 Martin**
číslo schválenia pokusného zariadenia **SK U 15016**

IČO: **00397865**

Zástupca zariadenia užívateľ'a: prof. MUDr. Ján Jakuš, DrSc.,

vykonanie projektu:

Koordinácia obranných mechanizmov respiračného traktu a kardiorespiračných funkcií u experimentálnych zvierat

Termín na vykonanie projektu: **od 01.01.2020 do 31. 12. 2022**

Osoba oprávnená predkladať projekt: **doc. RNDr. Michal Šimera, PhD., č.o. 1819/2015**

Osoba zodpovedná za starostlivosť o zvieratá a dobré životné podmienky zvierat: **doc. RNDr. Mariana Brozmanová, PhD., prof. MUDr. Ján Jakuš, DrSc.,**

Osoba zodpovedná za celkovú realizáciu projektu a za súlad projektu so schválením projektu:

doc. RNDr. Ivan Poliaček, PhD., – zodpovedný za súlad projektu so schválením projektu

doc. RNDr. Michal Šimera, PhD., č.o. 1819/2015 - zodpovedný riešiteľ predkladaného projektu,

Zmluvný veterinárny lekár: **MVDr. Tomáš Sheer**

na účel:

základný výskum podľa nariadenia vlády 377/2012 Z.z.

na druhu/chovnej línii/maximálnom počte pokusných zvierat:

mačka domáca/samce, samice/48 jedincov

králik domáci/novozélandský, samce/samice/48 jedincov

Nahradiťnosť – nie je možné nahradiť simulačným systémom variabilitu a jedinečnosť živého organizmu. Mačka, králik a morča sú vhodné modely využívajúce sa na štúdium obranných reflexov dýchacích ciest a sú z hľadiska aplikovateľnosti získaných výsledkov najvhodnejšie.

Redukcia – počty zvierat sú optimálne na dosiahnutie reprodukovateľnosti, validity a objektivity získaných výsledkov. V priebehu stanoveného obdobia sa vykoná 6 sérií postupov počas 3 rokov. Postupy budú vykonané na malom počte zvierat min. 6 jedincov. V jednej sérii sa použije 6-8 jedincov. Znižovanie počtu zvierat sa zabezpečí aj využitím počítačového modelovania a v plánovaní ak je to aplikovateľné na jednom zvierati sa vykoná viacero postupov počas jeho anestézy. Výsledky sa budú priebežne hodnotiť. Využijú sa kontrolné dáta z predchádzajúcich postupov.

Zjemnenie – v priebehu projektu sa budú vykonávať invazívne zákroky na anestetizovaných zvieratách. Zvieratá budú v karanténe pod dennou zdravotnou kontrolou. Počas anestézy, pri výkone projektu budú zvieratá monitorované. V prípade potreby je možné zviera napojiť na respiračnú podporu. Stabilná teplota je udržiavaná pomocou homeotermickej podpory. Stimulácia bolestivých stavov je eliminovaná aplikáciou lokálneho anestetika. Prvoradý cieľ je dosiahnutie relevantných výsledkov, na čo najnižšom počte zvierat v rámci zachovania všetkých zásad 3R.

Cieľom projektu bude študovať zmeny kardiorespiračných parametrov a obranných reflexov dýchacích ciest spôsobené moduláciou neurónov v oblasti pontínnej respiračnej skupiny mozgového kmeňa. Žiadateľ popísal ešte 3 ciele, ktoré sa budú plniť podľa popisu v žiadosti. Postupy sa budú prednostne vykonávať na mačkách, iba v prípade nedostatočného počtu kvalitných výsledkov sa prechádza na králik a morča. Každý použitý druh má svoje benefity. Pokiaľ sa dosiahne želaný cieľ na jednom druhu, iný druh sa nebude ani nakupovať. Vzhľadom na komplexnosť projektu a inú vyvolateľnosť reflexov, bude niečo iné skúmať na mačkách (prípadne IBA na mačkách) alebo na králikoch (prípadne IBA na králikoch). Projekt postupu bude vykonaný v celkovej anestéze, počas ktorej sa budú monitorovať všetky parametre ako dych, tlak, saturácia krvi, teplota tela. Počas celej doby anestézy budú zvieratá pod kontrolou. Projekt sa bude vykonávať podľa schémy určenej v žiadosti. V každom roku sa vykoná predpísaná séria postupov. Najhlavnejšie postupy budú : príprava zvierat na experiment, preparácia svalov, zavedenie kanyly, intubácia, mikroinjikovanie do vybraných oblastí mozgového kmeňa, do pontínnej respiračnej skupiny mozgového kmeňa, stimulácia periférnych nervov alebo ich blokovanie. Reflexné odpovede zvierat budú vyvolané mechanicky a chemicky vrátane aplikácie iritantov na povrch sliznice alebo aerosolom. Počas jedného dňa sa postup vykonáva iba na 1 jedincovi. Žiadateľ vypracoval human end point, podľa ktorého hodnotí zdravotný stav zvierat a v anestézii. Po ukončení vykonávania predpísaných analýz budú zvieratá humánne usmrtené v anestéze. Projekt bude vykonávaný v súlade s rozhodnutím o schválení projektu č. 3852/19-221/3

Odôvodnenie:

Toto rozhodnutie sa vydáva schválenému zariadeniu užívateľa č. SK U 15016 na základe žiadosti o schválenie projektu doručenej na ŠVPS SR dňa 07.10.2019. ŠVPS SR preposlala projekt čelnom poradnému orgánu na zhodnotenie. Počas hodnotiaceho procesu bolo vznesených viacero pripomienok. Z toho dôvodu ŠVPS SR vyzvala žiadateľa na odstránenie nedostatkov a rozhodnutím č.k. 3852/19-221/2 prerušila správne konanie. Žiadateľ doručil opravenú žiadosť a doplnenú o požadované údaje dňa 22.11.2019. Na základe toho poradný orgán vydal súhlasné stanovisko na jeho schválenie. ŠVPS SR posúdila žiadosť o schválenie projektu na základe stanoviska poradného orgánu hlavného veterinárneho lekára SR a predložených údajov v oblasti návrhu projektu, netechnického zhrnutia projektu, obsahových

Príloha č. 2 :

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

Názov projektu: 3766/12-221/3

Efekt a biodegradácia antiadhezívneho filmu s rôznym obsahom natívneho hyaluronanu a jeho derivátu na modeli pooperačných adhézii u potkanov

Kľúčové slová v projekte: zvierací model adhézie, natívny hyaluronan, derivát hyaluronanu

a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

Cieľom projektu bude zistiť efekt a biodegradáciu filmu z natívneho hyaluronanu i jeho derivátu pri rôznom množstve látky, hrúbky, hydrofobicite pre profylaktickú liečbu adhémie na štandardnom zvieracom modeli pooperačných zrástov potkanov.

Potkany sa podrobia operácii v celkovej i lokálnej anestézii. Pooperačný stav a doba pozorovania 14. resp. 28 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika.

Predpokladáme, že ujma na použitých zvieratách bude v prvých troch dňoch po operácii, kedy sa uskutoční proces hojenia vnútorného poranenia a incíznej rany na koži. Môže nastať krátkodobé zníženie príjmu krmiva po odznení účinkov anestézie. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie celkovým znecitlivením pri operácii a dennej aplikácii analgetík. Z hľadiska budúceho využitia zdravotného prostriedku v brušnej dutine po chirurgických zákrokoch u človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Očakávaným prínosom projektu bude pokračovanie vo vývoji a príprave aplikačných foriem zdravotníckeho prostriedku využiteľného v profylaxii vzniku pooperačných zrástov u ľudí s poškodením vnútrobrušného tkaniva vplyvom operačných zásahov.

V projekte sa použije celkom 220 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar).

Experimentálny model u potkanov sa vyvolá operáciou. Po druhom, resp. štvrtom týždni sa budú sledovať symptómy adhezívnych zmien vplyvom rôznych foriem testovanej látky. Zvieratám bude počas celého experimentu (14, resp. 28 dní) podávané každý deň krmivo a pitná voda *ad libitum*.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov:

Váženie zvierat- slabá

Jednorázová aplikácia anestetika i.m., s.c. aplikácia lokálneho anestetika - slabá

Aplikácia anestézie, analgetík, ATB i.m.- opakovane - stredná

Operačné zákroky sa vykonávajú v celkovej anestézii - stredná

Prežívanie zvierat po operácii - stredná

Pooperačný stav - stredná

Vyberanie stehov po zákroku vykonaný na zvieratách v anestézii - stredná

Individuálne umiestnenie po operácii a počas celého projektu za 14, resp. 28 dní v priehľadných klietkach – stredná.

Odber krvi z podchvostovej žily (1 kvapka) v čiastočnej anestézii – stredná.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Animálny model adhézie sa štandardne používa pri sledovaní účinkov potenciálnych látok ovplyvňujúcich adhézie vnútrobrušného prostredia. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R, ATLA) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania látok s antiadhezívnymi vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych potkanov tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť i validita postupu pre biochemické, hematologické, makroskopicko-morfologické, histologické analýzy, testovanie biodegradability, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú samčieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú zaradené kontrolné zvieratá v 28-dňovom postupe, keďže výsledky budú známe zo 14 dňového sledovania a nie je potrebné ich zaraďovať do ďalšej štúdie. Takisto sa nepoužije pozitívna kontrola (Septrafilm), pretože údaje o tejto látke boli sledované v predchádzajúcom projekte.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po presune z chovného zariadenia v aklimatizácii. Po dobu 7 dní sa umiestnia po štyri zvieratá v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 58x37x20cm) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Po operačnom zásahu sa ustajnia individuálne 14, resp. 28 dní, aby sa zamedzilo vytrhnutiu stehov, narušeniu hojaceho procesu i prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou. Potkany počas postupu prežijú výraznejší stres v operačnom a pooperačnom období, ktorý budeme minimalizovať podaním anestetík a analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie vanice sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu jedincov charakterizovaných v tabuľke human end points budú humánne usmrtené. Ošetrovatelia budú kontrolovať v prvých dvoch dňoch operované zvieratá 3-krát denne a v nasledujúcich dňoch 2-krát denne. O humánnom usmrtení bude rozhodovať veterinárny lekár na základe informácií od zodpovedných osôb za projekt. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii predávkovaním anestetík.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Ovplynenie obrany dýchacieho systému a s tým súvisiacich kardiorespiračných parametrov v *in vivo* experimente

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 3852/19-221/3

KLúčové slová v projekte (max 5 slov): kardiovaskulárny systém, respiračný systém, kašľový reflex, pontínna respiračná skupina, mikroinjikovanie

Účel projektu*: základný výskum

Opísať ciele projektu: 1) Zistiť zmeny kardiorespiračných parametrov a obranných reflexov dýchacích ciest spôsobené moduláciou (aktiváciou, inhibíciou, facilitáciou) neurónov v oblasti pontínnej respiračnej skupiny mozgového kmeňa.

2) Preskúmať koordináciu vyvolaných reflexných odpovedí (kašľa, aspiračného reflexu, prehĺtania a pod.) so základnými funkciami obehového a respiračného systému so zameraním na možné pozitívne a negatívne zmeny vo vitálnych funkciách vyvolanými indukovanými dejmi.

3) Preštudovať vplyv spazmodických reflexných dejov vyvolaných v respiračnom trakte na zmenené kardiorespiračné funkcie (apnoe, experimentálne indukovaná arytmia a pod.).

4) Odhaliť úlohu vybraných periférnych vstupov ich stimuláciou resp. blokadou, pri modulácii kardiorespiračných parametrov a indukovaných reflexov.

Prínos z vykonaného projektu: Dosiahne sa výrazné rozšírenie vedomostí o regulačných mechanizmoch kardiovaskulárneho a respiračného systému, obranných reflexov dýchacích ciest pri ich aktivácii periférnymi vstupmi ako aj o modifikovaných funkciách centrálnych štruktúr mozgového kmeňa. Stimulácie a zmeny v aktivite aferentných dráh a reflexné odpovede, vrátane ich modifikácie, umožnia analýzu interakcií týchto dejov za zmenených, napr. modelovo patologických podmienok. Predpokladáme uplatnenie rozličnej modality stimulácie a redukcie signálu v aferentných dráhach. Získané poznatky bude potenciálne možné aplikovať pri niektorých diagnostických alebo terapeutických postupoch v klinickej praxi.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty: králik domáci – 48 jedincov (na celé obdobie riešenia projektu), mačka domáca – 48 jedincov (na celé obdobie riešenia projektu), morča laboratórne – 48 jedincov (na celé obdobie riešenia projektu)

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Postupy sú vykonávané v štádiu chirurgickej anestézy. Hĺbka anestézy ako aj vitálne funkcie (krvný tlak, dychová frekvencia, CO₂ vo vydychovanom vzduchu, saturácia krvi kyslíkom a teplota tela) sú nepretržite monitorované. V prípade potreby je možné zviera okamžite napojiť na respiračnú podporu. Stabilná teplota tela je udržiavaná pomocou homeotermickej jednotky. Stimulácia bolesti je eliminovaná aplikáciou dostatočného množstva lokálnych anestetík.

Predpokladaná úroveň krutosti: Anestézované jedince – bez možnosti zotavenia

Uplatňovanie zásad 3R

1. *Nahradenie zvierat:* Nami vybrané zvieratá (mačka domáca, králik domáci a morča laboratórne) sú využívané v elektrofyziologickom výskume už mnoho desaťročí. Pri štúdiu reflexných odpovedí z respiračného traktu a ich kooperácie s inými systémami študujeme organizmus ako systémový celok z fyziologického aj patologického hľadiska. Z uvedeného dôvodu zatiaľ nie je možné študovať tieto deje na izolovaných orgánoch, tkanivách alebo baktériách. V súčasnosti je už síce možné využívať počítačové modely a simulačné techniky, ale to v obmedzenej miere a vstupné dáta vychádzajú z experimentálnych postupov na živých zvieratách. Mačka domáca príp. králik domáci a morča sú z hľadiska aplikovateľnosti získaných výsledkov v predklinických a klinických disciplínach humánnej medicíny najvhodnejšie. Nervové mechanizmy, antitusické pôsobenie látok atď. sú najlepšie preskúmané práve u týchto živočíšnych druhov. Výsledky získané z takýchto experimentov sú veľmi hodnotné a akceptované. Použitie "nižších" živočíšnych druhov ako. myš, potkan a pod. nie je možné, nakoľko nemajú vyvinuté niektoré druhy nami skúmaných reflexných odpovedí (napr. kašeľ) a experimentálne postupy a manipulácia s týmito druhmi sú veľmi limitované ich stabilitou, odolnosťou a veľkosťou.

2. *Redukcia počtu zvierat:* Na splnenie stanovených cieľov predpokladáme vykonať 6 sérií postupov v období 3 rokov. Jednotlivé postupy budú vykonané na čo možno najnižšom počte jedincov tak, aby boli výsledky štatisticky relevantné. Naše dlhoročné skúsenosti z výskumu potvrdzujú, že do jednej experimentálnej série je nutné zahrnúť minimálne 6 jedincov v závislosti od typu experimentu a variability získaných dát. Počet použitých jedincov je možné efektívne znižovať: 1) vykonaním viacerých postupov na jednom zvierati počas jedného experimentu; 2) priebežným hodnotením výsledkov so sledovaním úrovne štatistickej významnosti sledovaných parametrov; 3) použitím počítačových simulácií predikujúcich výsledky v experimentoch, 4) využitím skúseností, postupov a dát (najmä kontrolných) z predchádzajúcich postupov.

3. *Zjemnenie:* Počas trvania postupu sa budeme snažiť eliminovať všetky stresové faktory. Jedinec bude premedikovaný diazepamom (i.m) pre zabezpečenie sedatívneho účinku a hladšieho nástupu anestézie. Celková anestéza bude navodená i.p podaním anestetika priamo vo zverinci, čím sa minimalizuje stres spojený s prepravou na miesto vykonávania postupu. Počas postupu budeme nepretržite monitorovať a zaznamenávať všetky vitálne funkcie. Po ukončení postupu budú zvieratá humánne usmrtené predávkovaním anestetika.

Príloha č. 5

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Vplyv pohlavia na závažnosť prejavov experimentálne vyvolanej astmy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 4528/19-221

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): poškodenie pľúc, alergický zápal, zvýšená reaktivita dýchacích ciest, bronchiálna astma, protizápalová liečba

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 ochorenie pľúc môže viesť aj k nežiaducim zmenám iných orgánov (srdca, obličiek a pečene), čo môže zhoršiť celkový stav pacientov. V časti projektu, na ktorú žiadame o schválenie navýšenia počtu zvierat, vyvoláme model alergického zápalu a zvýšenej reaktivity dýchacích ciest podobný bronchiálnej astme, ktorý navodíme opakovaným podaním alergénu morčatám. V predtým schválenej časti projektu sme vytvorili tento model u samčiek morčiat. Vzhľadom na to, že pribúdajú správy o tom, že bronchiálna astma sa častejšie vyskytuje u žien a jej prejavy sú závažnejšie, žiadame o schválenie navýšenia počtu použitých zvierat o morčatá-samičky, na ktorých by sme vytvorili podobný model ochorenia. Po vytvorení experimentálneho modelu astmy podáme protizápalovú liečbu, po ktorej očakávame zlepšenie nielen pľúcnych funkcií, ale aj zlepšenie stavu iných orgánov.

Predpokladaný vlastný prínos projektu:

V prípade schválenia navýšenia počtu zvierat o samičky získame súbor kontrolných zvierat bez astmy a s astmou bez liečby, ktoré porovnáme navzájom ako aj s obdobnými skupinami u samčiek. Zistíme, či vôbec a v akom rozsahu sú prítomné rozdiely medzi pohlaviami v zápale a reaktivite dýchacích ciest, a tiež to, či sú na iných orgánoch (pečeň, srdce, obličky) prítomné druhotné zmeny v súvislosti s poškodením pľúc v modeli experimentálnej astmy. Nemenej dôležité bude aj porovnanie odpovede samičiek a samčiek morčiat na rôzne druhy protizápalovej liečby, ktorá sa podáva aj u pacientov s astmou. O prípadných rozdieloch v odpovedi na liečbu a ani o prípadných dopadoch vytvorenia modelu astmy resp. jej liečby na iné orgány medzi pohlaviami sme v literatúre nenašli žiadne informácie. Projekt prinesie nové informácie o zmenách v pľúcnom tkanive, tkanive srdca, obličiek a pečene vrátane analýzy plazmatických hladín liečiv apod. na modeli bronchiálnej astmy, ako aj informácie o zmenách v súvislosti s podaním protizápalovej liečby. Včasná diagnostika vyššie uvedených zmien a podanie vhodnej liečby priamo ovplyvňujú prežívanie pacientov.

Počet a druh zvierat:

Morča domáce (*Cavia porcellus*, kmeň Dunkin-Hartley), samica, 64 jedincov

Predpokladaná ujma na zvieratách:

Model „bronchiálnej astmy“ navodíme opakovaným podaním alergénu (ovalbumínu) morčatám. Kontrolným zvieratám bez astmy namiesto ovalbumínu podáme sterilný fyziologický roztok. Po vytvorení modelu astmy intraperitoneálne podáme liečbu, a to denne 15.-21. deň, na 21. deň zviera opäť vdýchne alergén, a následne bude usmrtené predávkovaním anestetika intraperitoneálne a bude mu odobratá krv zo srdca (exsangvinácia). Alergizácia ovalbumínom, podanie liečby ako aj ukončenie postupu predávkovaním anestetika a exsangvináciou sa uskutoční priamo v časti zverinca vyhradenej na takéto zákroky. Zvieratá neopustia známe priestory, čím budeme minimalizovať stres zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Model „bronchiálnej astmy“: Krutosť postupov v tejto etape projektu hodnotíme ako „strednú“, nakoľko pri vyvolávaní modelu „bronchiálnej astmy“ sú zvieratá v bdelom stave podrobené opakovanému intraperitoneálnemu alebo subkutánnemu vpichu resp. inhalačnému podaniu ovalbumínu, ako aj intraperitoneálnemu podávaniu liečiv. Zároveň je potrebné zohľadniť možné zhoršenie stavu prežívajúcich zvierat s modelom „bronchiálnej astmy“. Vzhľadom na druh ujmy (vyvolanie respiračného ochorenia) je možné predpokladať, že zvieratá môžu ojedinele 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.

Klasifikácia krutosti postupov projektu celkovo: „stredná“.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia:

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Štúdium zmien po vytvorení modelov bronchiálnej astmy a účinkov rôznych typov liečby sa v súčasnosti realizuje prevažne na myšiach, potkanoch a morčatách. Čiastkové výsledky je možné získať aj štúdiom zmien na myšiach, táto metodika však nie je pre nás vhodná, nakoľko je technicky a prístrojovo podstatne náročnejšia, dochádza pri nej k väčšiemu úhynu zvierat a výťažnosť výsledkov je neporovnateľne nižšia ako pri postupoch na morčatách. Postupy nie je možné nahradiť ani *in vitro* metódami, ani použitím počítačových simulácií. Použitie morčiat pre vytvorenie modelu bronchiálnej astmy je optimálnym riešením pre dosiahnutie cieľov projektu.

Obmedzenie (Reduction): Na získanie validných výsledkov použijeme 8 zvierat v každej skupine, 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.

Zjemnenie (Refinement):

Príprava „modelu bronchiálnej astmy“ sa u morčiat v bdelom stave realizuje opakovaným podávaním ovalbumínu i.p., s.c. alebo inh. podľa protokolu postupu. Po vytvorení modelu podáme liečbu i.p., a to denne 15.-21. deň, na 21. deň opakovaná expozícia OVA a následné usmrtenie zvierat podaním letálnej dávky anestetika a exsangvinácia.

Tab. 2. Všeobecné hodnotenie welfare zvierat'a

Parameter	Identifikácia zvierat'a	Skóre
Vzhľad	Normálny	0
	Absencia čistenia srsti	1
	Zježená srst', výtok z očí a nosa	2
	Piloerekcia, chýlenie sa	3
Príjem potravy a vody	Normálny	0
	Nepozorovaný: telesná hmotnosť ↓ o <5 %	1
	Prijíma: telesná hmotnosť ↓ o 10-15 %	2
	Neprijíma potravu ani vodu	3
Klinické príznaky	Normálna telesná teplota (T), normálny srdcový (S) a dychový (D) rytmus	0
	Mierne zmeny	1
	Zmena T o 1 °C, zmena S a D rytmu o 30 %	2
	Zmena T o 2 °C, zmena S a D rytmu o 50 %	3
Prírodné správanie	Normálne	0
	Mierne zmeny	1
	Zviera menej pohyblivé a pozorné, izolované	2
	Vokalizácia, sebamrzačenie, zviera nepokojné alebo nehybné	3
Provokované správanie	Normálne	0
	Mierna depresia alebo mierne prehnane reakcie	1
	Stredné zmeny v očakávanom správaní	2
	Reaguje prudko alebo veľmi slabo, prekomatózne	3
Skóre		0 – 15

Na konci každého štandardne prebiehajúceho postupu je zviera usmrtené vedúcim projektu alebo inou poverenou kvalifikovanou osobou podaním letálnej dávky anestetika (Zoletil+Xylariem) intraperitoneálne s následnou exsangvináciou.

V prípade zhoršenia zdravotného stavu zvierat'a, ktoré presahuje mieru očakávaného zhoršenia stavu v súvislosti s vyvolávaným ochorením, počas realizácie postupu vedúci projektu na základe výsledného human end-point skóre a po konzultácii s veterinárnym lekárom rozhodne o humánnom ukončení postupu eutanáziou (podaním letálnej dávky anestetika).

Tab. 3. Vyhodnotenie end-point skóre

0 - 4	Norma
5 - 9	Je potrebné stav zvierat'a starostlivo monitorovať, zvážiť podanie analgetík alebo inej liečby, konzultovať stav zvierat'a s veterinárnym lekárom.
10 – 15	Zviera trpí. Indikovaná eutanázia.

Zníženie (Reduction): Na získanie validných výsledkov použijeme 8 zvierat v každej skupine, 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.

Nahradenie (Replacement): Postupy projektu nie je možné vykonať bez použitia zvierat. Štúdium zmien po vytvorení modelov bronchiálnej astmy a účinkov rôznych typov liečby sa v súčasnosti v celosvetovom meradle realizuje prevažne na myšiach, potkanoch a morčatách. Čiastkové výsledky je možné získať aj štúdiom zmien na myšiach, táto metodika však nie je pre nás vhodná, nakoľko je technicky a prístrojovo podstatne náročnejšia, dochádza pri nej k väčšiemu úhynu zvierat a výťažnosť výsledkov je neporovnateľne nižšia ako pri morčatách. Použitie morčiat v tejto štúdii umožňuje realizovať všetky plánované vyšetrenia pľúc a iných orgánov, ako aj odber krvi na konci postupu, kým pri použití menších zvierat (myši) by sme boli nútení použiť vyšší počet zvierat v skupinách na to, aby sme získali relevantné množstvo výsledkov. Postupy nie je možné nahradiť ani *in vitro* metódami, ani použitím počítačových simulácií. Použitie morčiat pre vytvorenie modelu bronchiálnej astmy je v našich podmienkach optimálnym riešením.