

## AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU

1316/19-221/3

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

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:**

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

**Účel projektu:** základný/translačný výskum

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

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

### **Ciele projektu:**

V projekte sa budú sledovať nasledovné ciele:

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

### **Prínos z predpokladaného projektu:**

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

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

**Druhy použitých zvierat a ich počty:** Morča domáce kmeňa TRIK, 15 ks na 1 šaržu testovaného prípravku, samice (2 šarže), samce (2 šarže), spolu 60 ks

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

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

**Úroveň krutosti:** stredná

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

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

**1. Nahradenie:**

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

zvierat je pri tomto humánnom prípravku stále potrebné kvôli jeho širšej aplikácii v humánnej medicíne pri obnove zdravia pacientov.

## **2. Redukcia počtu zvierat:**

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

## **3. Zjemnenie:**

Zásada zjemnenia bola dodržiavaná v plnej miere. Počas odstavu prešli zvieratá procesom handlingu. V priebehu pokusu bolo utrpenie zvierat minimalizované na najnižšiu možnú mieru a zdravotný stav bol denne monitorovaný skúsenými a vyškolenými pracovníkmi. Pri odbere krvi zo srdca bol zvieratám stres zmiernený podaním analgetika Zoletil. Po podaní jednej dávky supresívnej látky sa nespozoroval negatívny priebeh zmien, spôsobený potlačením imunity a neohrozil tak život zvierat. Humane endpoint počast tohto projektu nenastal. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach s ohľadom na pohodu a zdravie zvierat s výrazným obohatením prostredia.

# AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU (Po spätnom posúdení)

## Názov projektu:

Príprava modelovej subcelulárnej vakcíny z manooligomérnych štruktúr kvasinky *Candida albicans* (APVV-15-0161)

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-3107/17-221/3

**Kľúčové slová:** manooligoméry *Candida albicans*, glykokonjugáty, humorálna a bunková imunita, prežívanie myši

**Účel projektu:** základný výskum

## Cieľ projektu:

Cieľom projektu bola príprava manooligosacharid-proteínových konjugátov, ktoré mali indukovať imunitný systém myši k tvorbe žiaduceho množstva protektívnych anti-manánových protilátok, a tak ich ochrániť pred infekciou patogénom *C. albicans*. Na posúdenie ochranného účinku testovaných glykokonjugátov boli imunizované myši podrobené experimentálnej infekcii letálnou dávkou *C. albicans*. Vplyv infekcie na správanie a zdravotný stav myši sa sledoval prostredníctvom ich prežívania, ako aj diseminácie patogénu *C. albicans* do vnútorných orgánov (slezina, obličky, pečeň). U vybraného manooligomérneho glykokonjugátu, ktorý mal najlepšie antifungálne vlastnosti, sa posudzovali jeho imunomodulačné vlastnosti z hľadiska humorálnej odpovede organizmu v krvných vzorkách zvierat (IgG, IgM, cytokíny). V tomto projekte sa po prvýkrát použili manooligoméry, pripravené z natívneho manánu, ktorý sa nachádza na povrchu bunkovej steny patogénu *C. albicans*.

## Čiastkové ciele:

1. Imunizácia jednotlivých skupín myši:
  - a) glykokonjugátmi, v ktorých sú manooligomérne antigény;
  - b) glykokonjugátmi, v ktorých sú sacharidovými antigénmi polymérne manány dvoch sérotypov *C. albicans*;
  - c) samotnými manooligomérmi ako aj samotnými manánmi;
  - d) manooligoméry-BSA;
  - e) Hwp-peptidom a BSA;
  - f) kontrolná skupina (schémy 1 a 2).

## Popis postupov v projekte:

1. V 1. etape sa myši imunizovali podkožne v oblasti medzi lopatkami tromi dávkami testovaných látok, s odstupom troch týždňov. Po uplynutí 28 dní od poslednej imunizácie sa myši infikovali letálnou dávkou *C. albicans* do chvostovej žily a sledoval sa ich zdravotný stav a prežívanie. Myši, ktoré javili známky nepohody v dôsledku vyvolanej kandidózy boli usmrtené dislokáciou krčných stavcov. Pred usmrtením sa myšiam odobrala krv z infraorbitálneho plexu. V priebehu infekcie sa aktuálne určila časová os, podľa ktorej sa myši utrácali. Z usmrtených myši boli odobraté orgány (slezina, obličky, pečeň), v ktorých sa sledoval rozsah diseminácie *C. albicans*.
2. V 2. etape sa myši imunizovali vybraným konjugátom, ktorý sa vybral podľa výsledkov z 1. etapy, rozhodujúcim kritériom bolo najdlhšie prežívanie, a malá alebo žiadna diseminácia *C. albicans* do orgánov. Postup sa ukončil po 90 dňoch od podania letálnej dávky *C. albicans*.

Myši boli usmrtené dislokáciou krčných stavcov.

V tejto etape sa navyše myšiam priebežne po každej imunizácii odoberala krv z infraorbitálneho plexu, ktorá sa použila na stanovenie imunomodulačných vlastností testovaných glykokonjugátov – kvantifikáciou hladín indukovaných špecifických anti-manánových protilátok (IgG a IgM) metódou ELISA, a na určenie polarizácie pro-Th1, pro-Th2 a pro-Th17 odpovede na základe produkcie cytokínov (ELISA).

V 2. etape sa myši imunizovali vybranými konjugátmi, obsahujúcimi manooligomér rovnako ako v 1. etape. Glykokonjugát sa vybral podľa výsledkov z 1. etapy, rozhodujúcim kritériom bolo najdlhšie prežívanie, a malá alebo žiadna diseminácia *C. albicans* do orgánov. Glykokonjugát sa podával myšiam injekčne pod kožu v oblasti lopatiek v troch dávkach, pred každou imunizáciou sa jednej skupine myší odoberala krv z infraorbitálneho plexu, po 28 dňoch sa infikovali letálnou dávkou *C. albicans* a sledovalo sa prežívanie. Počas experimentu sa sledovali zmeny telesnej hmotnosti zvierat. Okrem váženia sa sledovalo vzájomné správanie myší a ich celková kondícia.

### **Prínos projektu:**

Predkladaný projekt je orientovaný na oblasť ľudského zdravia, konkrétne na profylaxiu organizmu proti fungálnej infekcii, ako aj na terapiu už infikovaného organizmu. V súčasnosti sa v lekárskej praxi na liečbu kandidóz bežne používajú antifungálne liečivá, najmä zo skupiny echinokandínov, azolových a polyénových derivátov. Napriek dostupnosti širokého spektra antifungálnych liečiv je ich účinnosť stále nedostatočná, majú nežiaduce vedľajšie účinky a ich častým používaním dochádza v organizme k rozvoju rezistencie a často k rekurentným infekciám. Pre organizmus imonokompromitovaných a imonodeficientných jedincov predstavujú často vysoké dávky liečiv nežiaducu záťaž. Ideálnym riešením tohto problému by bola univerzálna antifungálna vakcína. Táto by bránila vstupu alebo množeniu cieľového patogéna a zároveň by nemala nepriaznivý účinok na organizmus. V prípade imunodeficientných jedincov prichádza do úvahy tzv. pasívna imunizácia, pri ktorej sa do organizmu vnesú špecifické protilátky alebo imunokompetentné bunky, vytvorené v inom jedincovi. Pasívne získaná imunita by mohla byť priaznivou formou imunoterapie, ktorá zabezpečí jedincom s oslabeným imunitným systémom priamu, aj keď iba dočasnú ochranu. Naopak, jedinci imunokompetentní, ale náchylní ku kandidóze, by sa mohli stať cieľovou skupinou pre aktívnu imunizáciu, pri ktorej by sa navodila imunitná odpoveď s dlhodobým ochranným účinkom podaním vhodnej vakcínovej formulácie. Ak výsledky predkladaného projektu potvrdia, že glykokonjugát s natívnym definovaným manooligomérom ako sacharidovým antigénom bude v organizme myší indukovať dostatočnú produkciu protektívnych protilátok s kandidacídnyimi vlastnosťami, ktoré ochránia myši pred infekciou *C. albicans*, mohli by tieto poznatky významnou mierou ovplyvniť smerovanie vývoja subcelulárnej antifungálnej vakcíny pre humánne použitie.

### **Druh použitých zvierat a ich predbežný počet:**

Druh: laboratórne myši, 6–8 týždňové samice, hmotnosť v čase začiatku experimentu 20–25 g

Kmeň: Balb/c

Dodávateľ: Chovné a dodávateľské zariadenie Velaz s.r.o., Praha, ČR

Plánovaný počet myší: 485 kusov

Skutočný počet použitých myší: 365

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

Imunizácia prebiehala u myší po dostatočne dlhej aklimatizácii a príprave handlingom. Zvieratám boli protilátky pichnuté podkožne v oblasti chrbta jednorazovo. Aplikácia bola vykonaná rutinne, skúseným pracovníkom. Zvieratá počas aplikácie netrpeli, jednalo sa o rýchly zákrok trvajúci

niekoľko sekúnd. Miesto vpichu bolo pred aj po aplikácii dezinfikované a nepozorovali sme žiadne systémové reakcie ani postaplikačné komplikácie po imunizácii.

Intravenózne vyvolanie infekcie *C. albicans* prebiehalo u zvierat navyknutých na manipuláciu. Zvieratám sa aplikovalo malé množstvo roztoku do chvostovej žily. Na aplikáciu zvieratá reagovali dobre a bezprostredne po aplikácii nevykazovali žiadne známky bolesti a stresu.

V prvej fáze projektu bolo použitých 194 zvierat, 1 uhynulo pred začatím pokusu z neznámych príčin (spolu 195 zvierat). U niektorých zvierat sme po infekcii zaznamenali úhyn, niektoré boli humánne utratené z dôvodu dostavenia sa systémovej reakcie. V prvej fáze bol počet zvierat, na ktorých sa vykonal krutý postup 103, na zvyšných zvieratách v počte 91 bol vykonaný stredný postup. V druhej fáze bolo použitých 170 zvierat. Z toho na 129 zvieratách bol vykonaný stredný postup a na 41 krutý. Systémová reakcia na infekciu *C. albicans* sa vo väčšine prípadov prejavovala stratou hmotnosti, zhoršením BCS, zmenou postoja, piloerekciami a torticolis. Pri pitve boli pozorované zmeny na obličkách. Ostatné orgány boli makroskopicky bez známok patológie..

### Úroveň krutosti postupov:

POSTUP	KRUTOSŤ
opakované subkutánne podávanie testovaných látok (tri dávky v trojtýždňových intervaloch)	stredná
odber krvi z infraorbitálneho plexu pred usmrtením myši	stredná
intravenózna infekcia živou kultúrou <i>C. albicans</i> do laterálnej chvostovej žily a následné prežívanie	krutá
usmrtenie dislokáciou krčných stavcov	stredná

### Navrhovaná klasifikácia krutosti postupov:

V zmysle klasifikácie krutosti postupu Oddiel I: a Oddiel II: Kritériá zaradenia do kategórií podľa zákroku a manipulácie so zvierat'om v prílohe č. 4 nariadenia vlády SR č. 37/2012 Z.z. Navrhujeme klasifikáciu podľa krutosti – krutá.

### Uplatňovanie zásad 3R

#### 1. Nahradenie zvierat:

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

V tomto projekte sa po prvýkrát testovali glykokonjugáty z manooligomérov, získaných z natívneho manánu *C. albicans*, prítomného v bunkovej stene patogénu. V uvedenom postupe sme testovali schopnosť viacerých pripravených glykokonjugátov indukovať v organizme myši imunologickú odpoveď na úrovni ich ochrany pred infekciou patogénom *C. albicans*. Podľa doby trvania prežívania infikovaných imunizovaných myši v jednotlivých skupinách sme určili, ktorý glykokonjugát má najlepšie predpoklady pre konštruovanie účinnej antifungálnej vakcíny. V nasledujúcich citovaných prácach (1–8) sú výsledky, týkajúce sa použitia glykokonjugátov pripravených z polymérneho manánu. V týchto prácach boli navrhnuté postupy, v ktorých sa použili zvieratá (myši, králiky, potkany). Použitie zvierat v postupoch bolo nevyhnutné pre monitorovanie špecifických protilátok, indukovaných v krvi zvierat testovanými látkami, taktiež pre sledovanie prežívania infikovaných zvierat, ako aj pre monitorovanie diseminácie patogénu do jednotlivých orgánov. Z uvedených dôvodov nie je možné realizovať postup v podmienkach *in vitro*, je potrebné uskutočniť ho *in vivo*.

#### Citácie

1. Han, Y., Ulrich, M. A., Cutler, J. E. *Candida albicans* Mannan Extract-Protein Conjugates Induce a Protective

- Immune Response against Experimental Candidiasis. *J Infect Dis*;179:1477- 84, 1999.
2. Wu, X., Lipinski, T., Carrel, F. R., Bailey, J. J., Bundle, D. R. Synthesis and immunochemical studies on a *Candida albicans* cluster glycoconjugate vaccine. *Org. Biomol. Chem.*, 5, 3477-3485, 2007.
  3. Xin, H., Dziadek, S., Bundle, D. R., Cutler, J. E. Synthetic glycopeptide vaccines combining -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. *PNAS* 105: 13526-13531, 2008.
  4. Liu, M., Machová, E., Neščáková, Z., Medovarská, I., Clemons, K.V., Martínez, M., Liu, M., Clemons, K.V., Bigos, M., Medovarska, I., Brummer, E., Stevens, D. A. Immune responses induced by heat killed *Saccharomyces cerevisiae*: A vaccine against fungal infection. *Vaccine* 29:1745-1753, 2011.
  5. Chen, V., Bystrický, S., Stevens, D.A. Vaccination with Mannan Protects Mice against Systemic Aspergillosis. *Med Mycology*, 50(8), 818–828, 2012.
  6. Paulovičová, L., Paulovičová, E., Karelín, A. A., Tsvetkov, Y. E., Nifantiev, N. E., Bystrický, S. Humoral and cell-mediated immunity following vaccination with synthetic *Candida* cell wall mannan derived heptamannoside–protein conjugate. Immunomodulatory properties of heptamannoside–BSA conjugate. *Int. Immunopharmacology* 14, 179-187, 2012.
  7. Paulovičová, E., Paulovičová, L., Pilišiová, R., Bystrický, S., Yashunsky, D. V., Karelín, A. A., Tsvetkov, Y. E., Nifantiev, N. E. Synthetically prepared glycooligosaccharides mimicking *Candida albicans* cell wall glycan antigens – novel tools to study host–pathogen interactions. *FEMS Yeast Res* 13, 659–673, 2013
  8. Neščáková, Z. 3<sup>rd</sup> Meeting of Middle European Societies for Immunology and Allergology, Budapešť, 1.12-3.12.2016, Abstract book P4-09, pp 96-97.

Na hľadanie alternatívnej metódy, ktorou by sme nahradili použitie myší, sme použili registre medzinárodne overených a uznaných metód (ECVAM, NC3Rs, AltTox). V týchto registroch sme nanašli žiadnu alternatívnu metódu, ktorou by sme mohli nahradiť použitie myší v plánovanom postupe.

## **2. Redukcia počtu zvierat:**

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

Počty myší sú upresnené v nasledujúcich etapách projektu:

### **1. etapa postupu: január 2018–jún 2018**

Pre uskutočnenie 1. etapy postupu (február 2018–jún 2018) bolo použitých 195 zvierat, každá látka bola testovaná na 15 myšiach. Tento počet bol postačujúci, ďalšie znížovanie počtu zvierat v skupinách by bolo rizikové, jednak z hľadiska štatistického vyhodnotenia, ako aj falošne pozitívnych alebo negatívnych výsledkov.

### **2. etapa postupu: september 2018–december 2019**

Pre uskutočnenie 2. etapy postupu (september 2018–december 2019) bolo použitých 170 zvierat. Každá látka bola testovaná na 34 myšiach, tento počet bol postačujúci jednak z hľadiska štatistického vyhodnotenia, ako aj na elimináciu falošne pozitívnych alebo negatívnych výsledkov. Zvýšený počet zvierat na skupinu v tejto etape odôvodňujeme tým, že u týchto zvierat bola odoberaná krv aj v priebehu imunizácie, a aby zvieratá neboli vystavené opakovaným odberom krvi, boli rozdelené do podskupín.

Tento počet, naplánovaný pre obe etapy, splnil požadované kritériá reprodukovateľnosti postupu z hľadiska štatistického vyhodnotenia.

V druhej fáze projektu bolo použitých menej zvierat (celkový počet použitých zvierat bol o 120 nižší v porovnaní so schválením), pretože sa použilo menej testovaných skupín. Po dôkladnom vyhodnotení prvej fázy projektu sa dospelo k záverom, ktoré pomohli vylúčiť použitie niektorých konjugátov.

## **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.)

Na tento postup bola vybraná myš laboratórna Balb/c, ktorá spĺňa požiadavky na úspešný priebeh navrhnutého postupu. Myši boli pod každodenným dohľadom odborných pracovníkov, ktorí im zabezpečili požadovaný komfort počas trvania postupu. Všetky aktivity, ktoré súviseli s realizáciou postupu, boli vykonávané v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá. Ešte pred samotným vykonávaním postupu sa myši v priebehu dvojtýždňovej karantény adaptovali na nové prostredie a kontakt s veterinárnou lekárkou ako aj s osobami spôsobilými na tento výkon – s ošetrovateľským personálom. Postupy vykonávané na zvieratách boli vykonané odborne a u zvierat navyknutých na manipuláciu. V prípade dostavenia sa klinických príznakov, ktoré poukazovali na možné utrpenie zvierat'a, bolo potrebné vykonať humánne usmrtenie. U skupín, u ktorých sa predpokladal nižší protektívny účinok testovaných konjugátov a u kontrolných skupín sme predpokladali rýchlejší nástup systémovej reakcie, boli výraznejšie označené a bola im venovaná zvýšená pozornosť.

#### **4. Utrpenie verzus prínos**

V plánovanom postupe neboli myši vystavené zbytočnému utrpeniu, v prípade zhoršeného zdravotného stavu v dôsledku postupujúcej kandidózy boli myši usmrtené. Výsledky z projektu môžu významne ovplyvniť navrhnutie a následnú konštrukciu účinnej antifungálnej vakcíny, ktorá by sa v budúcnosti mohla využiť ako pre imunokompromitovaných pacientov, postihnutých kandidózou, tak aj pre pacientov s chronickou kandidózou.

**Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: ÁNO (podľa nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.)**

Bratislava, 10. 03. 2020

## AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU Č. 39

1062/19-221/3

### Názov projektu:

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

### Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

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

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

### Cieľ projektu pokusu, predpokladaná ujma a prínosy:

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

Účelom skúšky bolo určiť telesnú teplotu u králikov za použitia podkožného snímača teploty – loggera s následnou aplikáciou očkovacej látky.

**Cieľom projektu** bolo sledovať u králikov zvyšovanie sa telesnej teploty použitím podkožných snímačov teploty - STAR ODDI DST micro-T po podaní testovaného a kontrolného prípravku. Snímač telesnej teploty bol umiestnený kontralaterálne za lopatku do operačne vytvorenej podkožnej kapsy. Králiky boli v celkovej anestéze. Anestézu vykonával zmluvný veterinárny lekár. Pri návrhu skúšky sme vychádzali z dostupných publikácií, ktoré pojednávajú o použití králikov pri teste celobunečnej vakcíny proti *Bordetella Pertussis* na pyrogény (Verwer *et al.*, Reducing variation in a rabbit vaccine safety study with particular emphasis on housing conditions and handling, Lab. Anim. 2009, 43: 155, Kaaik *et al.*, Nonclinical vaccine safety evaluation: advantages of continuous temperature monitoring using abdominally implanted data loggers, J. Appl. Toxicol. 2013; 33: 521–526; Dias *et al.*, An improved whole pertussis vaccine with reduced content of endotoxin, Human vaccines and

immunotherapeutics, 9:2, 339 – 348, February 2012). Podľa týchto publikovaných štúdií, nárast teplôt u králikov bol pozorovaný v rozmedzí 5-12 hodín po podaní celulárnej vakcíny s najvyšším nárastom teplôt pri 8 hodinách od podania. Z týchto publikácií zároveň vyplýva, že vzostup teplôt je pomerne nízky v rozmedzí cca 0,5-1°C. Dôležitú úlohu pri celom teste zohrávala šetrná manipulácia so zvieratami a návyk králikov na personál a procedúry, ktoré sú na nich počas skúšky vykonávané. Nevhodné zaobchádzanie, či nové stimuly mohli navodiť stresový stav a vzostup telesnej teploty králikov, čo by mohlo viesť k skresleniu výsledkov skúšky.

#### **Prínosy z vykonaného projektu:**

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

#### **Predpokladaná ujma na použité zvieratá v rámci vykonaného postupu:**

V projekte sa aplikovali podkožného snímača telesnej teploty a parenterálne aplikoval testovaný a kontrolný prípravok. Ujmov bolo mierne začervenanie a opuch v mieste operačného poľa. V mieste aplikácie testovacieho prípravku ako aj kontrolného prípravku sme nepozorovali žiadnu lokálnu reakciu.

<b>Charakteristika postupu</b>	<b>Vplyv na zviera</b>	<b>Zaradenie podľa krutosti</b>
Váženie zvierat	Krátkodobý mierny stres	slabé
Krátka fixácia pri aplikácii	Krátkodobý mierny stres	slabé
Jednorázová i.m. aplikácia test. látky	Krátkodobé obmedzenie, bolesť slabá	slabé
Opakovaná i.m. aplikácia ATB a analgetík	Krátkodobé obmedzenie, bolesť stredná	stredné
Aplikácia podkožného snímača	Chirurg. zákrok v celkovej anestézii	stredné
Rekonvalescencia po chirurgickom zákroku	Podávanie analgetík na zmiernenie prípadných bolestí	slabé
Testovanie očkovacej látky	Zvýšená telesná teplota.	stredné

**Predpokladaná úroveň krutosti:** Stredné

**Počet a druh pokusných zvierat**

Králik domáci, samice, 10 ks zvierat pre testovanie každej vyrobenej šarže RALDITEPERY.

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

Stanovený počet zvierat predstavuje limit, ktorý je nevyhnutný pre získanie dostatočného počtu vzoriek pre validné vyhodnotenie výsledkov zmien v vzostupe telesnej teploty u králikov po podaní očkovacej látky. Nie je možné nahradiť postup na zvieratách *in vitro* testami na bunkových líniiach. So zvieratami zaobchádzali zaškolené osoby s dlhoročnými praktickými skúsenosťami. Zásada zjemnenia bola dodržiavaná v plnej miere odo dňa dodávky zvierat do zvieratníka. Počas karantény prešli zvieratá procesom handlingu. Pri štandardnej dennej jemnej manipulácii si zvykli na prítomnosť človeka a na bežné denné procedúry (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Po operačnom zákroku bola zvieratám poskytnutá maximálna starostlivosť, v rátane podávanie analgetík po dobu 5 dní. Humane end point nepresiahol stanovené skóre pre predčasné usmrtenie jednotlivých zvierat.

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