

PRÍLOHA Č. 2

Netechnické zhrnutie projektu podľa §35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

Názov projektu:

MECHANIZMY, SKORÁ DETEKCIA A TERAPIA ASFYKTICKÉHO POŠKODENIA V PERINATÁLNOM OBDOBÍ
– Teratologická štúdia 1374 | 16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

hypoxia, perinatálna asfyxia, malformácie, zvieracie modely, rastlinné extrakty

Účel projektu: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Použitím vhodného animálneho biomodelu pre testovanie teratogenity a využitím neinvazívneho modelu perinatálnej asfyxie pre štúdium asfyktických podmienok počas gravidity budeme monitorovať asfyktické podmienky u matky a plodu. Za perspektívny faktor zníženia oxidačného stresu, ako jednej zo závažných príčin vzniku a rozvoja neurodegeneratívnych ochorení sa okrem iného považuje aj stabilný príjem prirodzených antioxidantov napr. vo forme štandarizovaných extraktov liečivých rastlín, alebo niektorých z nich izolovaných obsahových látok. Preto otázka ich relatívnej bezpečnosti z hľadiska ich účinku na matku a plod je veľmi aktuálna.

Konkrétne:

1. Hodnotenie kvantitatívnych a kvalitatívnych ukazovateľov u matiek a plodov potkanov v modeli subchronickej asfyxie indukovanej v senzitívnych obdobiach vývin mozgu:
 - teratologické vyšetrenie plodov podľa OECD predpisov
 - histopatologické vyšetrenie placent a orgánov plodov
 - elektroforeticky sa vyšetria proteínové spektrum plodovej vody resp. biochemické markery oxidačného poškodenia v plodovej vode
2. Hodnotenie schopnosti rastlinných extraktov (*Agrimonia eupatoria*, *Cynara cardunculus*, *Matricaria recucita*) znížiť následky asfyktického inzultu v modeli subchronickej perinatálnej asfyxie :
 - teratologické vyšetrenie plodov podľa OECD predpisov
 - histopatologické vyšetrenie placent a orgánov plodov
 - elektroforeticky sa vyšetria proteínové spektrum plodovej vody resp. biochemické markery oxidačného poškodenia v plodovej vode

Výsledky jednotlivých experimentálnych štúdií prispievajú k lepšiemu poznaniu príčin a mechanizmov asfyktického poškodenia v období vývinu a jeho odhalenia na základe hodnotenia toxikologických,

biochemických a morfológických ukazovateľov v dostupných telesných tekutinách (plodová voda), ktorých odber by nezaťažil organizmus. Dôležitou súčasťou projektu bude hodnotenie protektívnych schopností štandarizovaných extraktov vybraných liečivých rastlín z hľadiska ich účinku na asfyktickú matku a plod.

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

Výsledky jednotlivých experimentálnych štúdií prispievajú k lepšiemu poznaniu a pochopeniu mechanizmov asfyktického poškodenia v období prenatalného vývinu a jeho možného odhalenia na základe hodnotenia toxikologických, biochemických a morfológických ukazovateľov v organizme matky, plodov a plodovej vody. Neoddeliteľnou súčasťou postupov bude zisťovanie relatívnej bezpečnosti štandarizovaných extraktov liečivých *Agrimonia eupatoria*, *Cynara cardunculus* a *Matricaria recutita* z hľadiska ich účinku na prenatalný vývin plodu potkanov.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkany kmeňa Wistar chovu Dobrá Voda
210 ks samíc, vek 3-4 mes, hmotnosť 180-200 g
75 ks samcov, vek 3-4 mes, hmotnosť 240-260 g
Počet plodov 210 x 12 = 2520 ks

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

Model subchronickej prenatalnej asfyxie (SPA), ktorý použijeme pri realizácii projektu je u gravidných samíc dobre znášaný. Z historických dát neevidujeme nepriaznivé účinky asfyktického inzultu na gravidné samice. Znížené množstvo parciálneho kyslíka, môže u zvierat spôsobiť diskomfort v podobe malátnosti, zvýšenej srdcovej činnosti, zvýšenej dýchavičnosti. Po celú dobu pôsobenia inzultu a minimálne hodinu po jeho skončení je sledovaný zdravotný stav zvierat. V prípade výskytu nežiaducích príznakov bude postup asfyktického inzultu prerušený. Po skončení pôsobenia inzultu nastupuje motorická aktivita zvierat a po hodine sú úplne čulé so záujmom o krmivo a vodu. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov z prenatalného programovania.

Predpokladaná úroveň krutosti:

POSTUP	KRUTOSŤ
príparovanie	slabá
SPA	slabá
podávanie vodných extraktov	slabá
teratologické vyšetrenie	bez možnosti zotavenia
celkovo	slabá / bez možnosti zotavenia

Navrhovaná klasifikácia krutosti postupov.

V zmysle Klasifikácie krutosti postupu, Oddiel I: a Oddiel II: Kritéria zaradenia do kategórií podľa zákroku a manipulácie so zvieratom v prílohe č.4 nariadenia vlády SR č. 37/2012 Z.z. navrhujeme klasifikáciu podľa krutosti slabá/ bez možnosti zotavenia.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

V uvedenom postupe je potrebné získať komplexnejšie informácie o možných nepriaznivých účinkoch pôsobenia asfyktického inzultu v senzitivnom období prenatalného programovania. Dôraz budeme klásť na sledovanie štrukturálnych a funkčných zmien po asfyxii a hľadanie vhodných biomarkerov poškodenia v dostupných biologických tekutinách u matky a plodu. Z uvedených dôvodov pokus nie je možné realizovať v podmienkach *in vitro*, je potrebné ho uskutočniť *in vivo*. Rovnako nie je možné pokus vykonať na systematicky nižšom druhu živočíchov. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 414 (2001) „Prenatal Developmental Toxicity Study“.

Ref: OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 414 (2001) „Prenatal Developmental Toxicity Study“.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Z našich predchádzajúcich štúdií, kde sme použili uvedenú metodiku SPA sme zistili, že počty postupov tak ako sú špecifikované v protokole sú nevyhnutné (minimálne) na hodnoverné (štatisticky signifikantné) zachytenie predpokladaných efektov na dosiahnutie našich cieľov. Ďalšie znižovanie počtu zvierat v postupe je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným postupom na ďalších zvieratách. Inými slovami, počty zvierat pri jednotlivých postupoch sú vybraté tak, aby minimalizovali celkový počet postupov nevyhnutných na dosiahnutie cieľov projektu. Počet zvierat je tiež maximálne redukovaný logistikou pokusov. S ohľadom na kvalitu života zvierat, ale aj limitované financovanie a časovú náročnosť postupov v projekte a ich analýza je v našom najlepšom záujme vykonať čo najmenej postupov na získanie interpretovateľných výsledkov a použiť čo najmenej zvierat na získanie validovaných dôležitých poznatkov nevyhnutných pre reprodukovateľnosť a validitu projektu, pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich správnu štatistickú interpretáciu. Reprodukovateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. K zvieratám ovplyvnených H/I v perinatálnom období (15.- 16., 19.-20., 15. a

20. deň gravidity (DG)) je potrebné priradiť kontrolnú skupinu zvierat neovplyvnených asfyxiou za účelom zistenia jej negatívneho pôsobenia. Minimálny počet zvierat na jeden časový úsek je 15 samíc. Počty zvierat potrebných v teratologickej štúdii rastlinných extraktov zodpovedajú požadovaným počtom zvierat v prenatalnej reprodukčnej štúdii podľa OECD.

3. Zjemnenie:

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

So zvieratami sa bude šetrne zaobchádzať po celú dobu projektu a budú pod každodenným dohľadom skúsných pracovníkov. Počas postupov je zabezpečený komfort zvieraťa, minimálna manipulácia, takže zvieratá nie sú traumatizované a prípadná bolesť (diskomfort) je len dočasná a minimálna. Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami, v záujme odbúravania stresu zvieratá budú adaptované na personál a laboratórne podmienky ešte pred samotným vykonávaním postupov. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované množstvom prác a prezentované na mnohých odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Postupy sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov prispievajúcich k efektívnej farmakoterapii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Bratislava, 15.2. 2016

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU 1354/16-221

Názov projektu: *Odpovede krvného tlaku indukované akútnym podnetom: endotelové faktory vs. centrálna regulácia sympatikového tonusu*

Kľúčové slová: endotelové faktory, centrálna regulácia krvného tlaku, sirovodík, antioxidanty, vápnikové kanály

Účel projektu: základný biomedicínsky výskum

Cieľ projektu

Cieľom projektu je priniesť nové poznatky o endotelových faktoroch v modulácii presorickej odpovedi na akútny podnet u normotenzných a hypertenzných jedincov, ako aj odhalenie mechanizmov ich pôsobenia t.j. či lokálne mediátory môžu výrazne modifikovať veľkosť presorickej odpovedi indukovanej akútnym podnetom. Odhalenie rozdielov v odpovediach krvného tlaku na akútny stresový podnet môže viesť k zisteniu mechanizmu, ktorý by mohol byť využitý na selektívne zníženie nebezpečného zvýšenia krvného tlaku u hypertenzných jedincov a tak prispieť k prevencii infarktu myokardu a mozgovej príhody v dôsledku náhleho a neprimeraného zvýšenia krvného tlaku po pôsobení akútneho stresora.

Prínos projektu

Projekt priniesie nové poznatky o mechanizmoch, ktorými oxid dusnatý, sirovodík, voľné kyslíkové radikály na úrovni endotelu ovplyvňujú presorickú odpoveď na akútny podnet. Ako nadstavba tohto experimentu budú získané dáta okrem fyziologických výstupov použité aj na postupné vypracovanie matematického modelu regulácie krvného tlaku. Model môže v budúcnosti slúžiť na pedagogické účely tým, že umožní vyhodnocovanie a modelovanie jednotlivých záťažových situácií bez ďalšieho použitia zvierat.

Druh použitých zvierat a ich predbežný počet

Druh: Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*),

kmeň Wistar-Kyoto, n=103

Spontánne hypertenzný potkan (SHR), n=103

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

Potkanom bude implantovaný katéter do karotickej artérie na meranie krvného tlaku a druhý katéter do jugulárnej vény slúžiaci na podávanie farmák. Katétre a podávané farmaká môžu spôsobiť diskomfort. Aplikovaný bude krátky stresogénny podnet vo forme 3-5s prúdu vzduchu do tváre za vzdialenosti cca 5-8 cm, ktorý je bezbolestný, ale vyvoláva akútnu zmenu krvného tlaku.

Predpokladaná úroveň krutosti: stredná krutosť

Súčasťou experimentu je zavedenie katétrov a vystavenie, ktoré môžu vyvolať dlhotrvajúcu (cca 30h) strednú bolesť, a krátkodobé utrpenie alebo strach. Tento postup sa klasifikuje ako stredne krutý (príloha č. 4 nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z. z.). Testovanie regulačných mechanizmov krvného tlaku je spojené s podávaním farmák a vystavením akútnemu podnetu, ktoré môžu stredne narušiť pohodu zvierat.

Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód

V súlade s § 12 Nariadením vlády SR č.377/2012 sme vykonali overovanie v registroch medzinárodne overených a uznávaných alternatívnych metód, či k plánovanému pokusu neexistujú alternatívne metódy, pri ktorých nemusí byť použité zvieratá. Výsledok vyhľadávania bol negatívny: na použité metódy v pripravovanom experimente neboli nájdené žiadne alternatívne metódy, ktoré by sa dali uskutočniť bez použitia experimentálneho zvieratá. Vyhľadanie sa uskutočnilo po zadaní nasledujúcich kľúčových slov: alternative methods, alternative testing, alternative experiments, animal models, acute stress, hypertension, endothelium, virtual rat. Vyhľadanie v databázach ECVAM, ISSVAM, GO3R-Pubmed a na stránkach uvedených nižšie neprinieslo žiadne výsledky.

<http://www.iaapea.com>
<http://www.bfr.bund.de/cd/1508>
<http://awic.nal.usda.gov/alternatives/techniques-methods-procedures-and-models>
<http://www.minzp.sk/>
<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
<http://iccvam.niehs.nih.gov/>
<http://www.altex.ch/en/Links/Links-with-3R-relevance.58.html>

Okrem toho sme vo vyhľadávачi www.google.com hľadali výsledky pre nasledovné frázy:

- 1) alternatívne metódy zisťovania funkcie endotelu (alternative methods for determination of endothelial function)
- 2) alternatívne metódy regulácie krvného tlaku (alternative methods for blood pressure regulation)

Literatúra:

1. Flecknell P: Replacement, reduction and refinement. ALTEX. 2002;19(2):73-8.
2. Gura T: Systems for identifying new drugs are often faulty. Science. 1997 Nov 7;278(5340):1041-2.
3. Huggins, J: Communication by Keyword: Sharing Information About Alternatives to Animal Testing. Animal Welfare Information Center (AWIC) Newsletter 8 No 2 1997.
4. Kreger, M. D. Alternative Methods Databases: Internet Resources That Are More Than Links to Other Sites. Animal Welfare Information Center Bulletin, Winter 1999/2000, Vol.10 No.3-4
5. Stilli D, Berni R, Sgoifo A, Costoli T, Bocchi L, Cacciani F, Manghi M, Olivetti G, Musso E. Physiol Behav. 2001 Jun;73(3):351-8. Social stress, myocardial damage and arrhythmias in rats with cardiac hypertrophy.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat

V biomedicínskom výskume, rovnako teda aj výskume regulačných mechanizmov uplatňujúcich sa v regulácii krvného tlaku na centrálnej úrovni a pomocou endotelových faktorov na periférnej úrovni, je zatiaľ použitie laboratórneho potkana nevyhnutné a nenahraditeľné. Dokumentuje to časť Doklad o overovaní v registroch medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nemáme inú možnosť ako použiť laboratórnych potkanov.

2. Redukcia počtu zvierat:

V experimentoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily. Maximálna využiteľnosť a vyťaženosť bude zabezpečená tým, že optimalizujeme počet meraní pri splnení cieľa pokusu.

3. Zjemnenie:

Bolestivosť chirurgických zákrokov (zavedenie katétrov) bude eliminovaná anestéziou s použitím izofluránu (3,5%) a preventívnou analgéziou meloxicamom (2 mg/kg). Po skončení experimentu budú zvieratá humanne utratené: najskôr sa vystavia oxidu uhličitému v uzavretej nádobe až do straty vedomia; v hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

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

Názov projektu: - 1030/16-221

ŠTÚDIUM DÔSLEDKOV MATERSKEJ DEPRESIE A PODÁVANIA ANTIDEPRESÍVA VENLAFAXÍNU NA FUNKČNÝ VÝVIN MOZGU A SPRÁVANIE POTOMSTVA POTKANOV (VEGA 2/0168/15)

a) Ciele projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

V lekárskech kruhoch dodnes nie je jednoznačne zodpovedaná otázka, či liečiť, alebo neliečiť tehotnú a dojčiacu matku antidepresívami. Neliečená materská depresia ale aj používanie antidepresív môže nepriaznivo ovplyvniť vývin plodu a novorodenca. Antidepresíva sú lieky, ktoré harmonizujú nerovnováhu monoamínov v mozgu. Akékoľvek zmeny na úrovni monoamínov počas vývinu môžu viesť k funkčným poruchám mozgu s následnými neurobehaviorálnymi dysfunkciami v neskoršom postnatálnom období. Cieľom projektu bude pokračovať v experimentálnom výskume účinku antidepresívneho lieku venlafaxínu podávaného krátko pred pôrodom a počas laktácie samotne, ako aj v kombinácii s materskou depresiou, na funkčný vývin mozgu a správanie potomstva potkanov. Tento výskum je dôležitý aj pre klinickú prax, pre ktorú výsledky riešenia projektu môžu znamenať prehodnotenie používania venlafaxínu počas tehotenstva a dojčenia. Prínosom projektu budú originálne poznatky o vplyve liečenej a neliečenej depresie v skorých štádiách vývinu mozgu, ktoré by prispeli k poznatkom pri prevencii a liečbe depresie počas tehotenstva a laktácie. V postupoch použijeme 80 dospelých laboratórnych samíc, 10 dospelých samcov a následne ich potomstvo kmeňa Wistar/DV.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Replacement (nahraditeľnosť zvierat)

V uvedenom pokuse je potrebné získať komplexné informácie o možných nepriaznivých účinkoch testovanej látky hodnotením behaviorálneho, neuroendokrinného a neurochemického statusu potomstva potkanov. Pokus nie je možné realizovať v podmienkach *in vitro*, je potrebné ho uskutočniť *in vivo*. Rovnako nie je možné pokus vykonať na systematicky nižšom druhu živočíchov. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study (EPA, 1998) a OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Draft Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study (OECD, 1995) odporúčajú štúdie vývinovej neurotoxicity vykonávať na laboratórnych potkanoch.

Ref.:

EPA (1998), *Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.6300, Developmental Neurotoxicity Study, EPA 712-C-98-239.*

OECD (1995), *Guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for a new guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study.*

Reduction (znižovanie počtu zvierat)

Reprodukateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. K zvieratám ovplyvnených depresiou ako aj VENN je nutné priradiť kontrolnú skupinu zvierat, teda zdravých zvierat neliečených za účelom zistenia možného negatívneho pôsobenia depresie ako aj liečiva. V štúdiu celkovo použijeme 80 samíc a 10 samcov potkanov Wistar. Maximálny počet mláďat vo vrhu s matkami bude 384 (96 mláďat na skupinu oboch pohlaví. Ide o najnižší možný počet zvierat v jednotlivých skupinách, ktorý môže byť štatisticky hodnotiteľný (10-12 na skupinu).

Refinement (zjemnenie pokusu)

S cieľom minimalizovať stres u zvierat, budú pri experimente prítomné len osoby nevyhnutné na vykonanie samotného pokusu, ktoré budú k zvieratám pristupovať veľmi šetrne. Počas celého priebehu experimentu bude o zvieratá náležite postarané, budú ošetrované odbornými pracovníkmi experimentálneho zverinca ÚEFT SAV a pravidelne kontrolované vedúcim experimentu. Pri ošetrovaní experimentálnych zvierat bude dodržiavaná každá z piatich slobôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Dospelé gravidné a laktujúce zvieratá budú umiestnené individuálne. Mláďatá do obdobia odstavu na 21. deň veku budú umiestnené s matkou, po odstave v skupine po 3-4 zvieratá v jednej chovnej kletke. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Zvieratá budú pri použitých testoch minimálne vystavené stresu a bolesti.

Späťne posúdenie: nie

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Vplyv zásahu do metabolizmu tryptofánu na renálne poškodenie v modeli ischemicko-reperfúzneho poškodenia obličky u potkana

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

998/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): IDO, IRI, AKI, oxidačný stres, apoptóza, fibróza, zápal

Účel projektu: Translačný alebo aplikovaný výskum

Opísať ciele projektu:

Ischemicko-reperfúzne poškodenie obličky (IRI) je častou príčinou akútneho poškodenia obličiek (AKI). IRI vyplýva z niekoľkých faktorov, ktoré ovplyvňujú ako renálny tubulárny epitel tak aj renálnu mikrocirkuláciu. Ischémia výrazne znižuje intracelulárne ATP spojenie a iniciuje poškodeniu buniek, ktoré je ešte zhoršené zvýšením oxidačného stresu, apoptózy a zápalu. IDO (indolamindioxigenáza) je enzým, ktorý metabolizuje tryptofán za vzniku štiepných produktov ako sú kynureníny. Úloha IDO v IRI nebola dosiaľ dostatočne popísaná - niektoré práce ukazujú, že IDO by mohlo byť v IRI prínosné a iné, ukazujú opak a navyše, úloha IDO v IRI u potkana nebola doteraz skúmaná. Preto je nutné preskúmať úlohu IDO v IRI, a to hlavne jeho vplyv na oxidačný stres, apoptózu, zápal a ďalšie parametre, ktoré sú pri IRI zmenené a prispievajú k AKI.

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

Výsledky tejto práce by mohli byť užitočné pre pacientov liečiacich sa na AKI, ako napríklad po transplantácii obličky, alebo inak spôsobenou AKI.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan (*Rattus norvegicus*), druh Lewis, samce.

Počet na celú dobu trvania experimentu (5 rokov): 400 zvierat

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

Abdominálne zákroky sú spojené s diskomfortom, a preto post operačne bude potkanom podané analgetikum.

Predpokladaná úroveň krutosti:

a) **stredné**

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

Nahradenie zvierat nie je možné, keďže poškodenie obličiek u ľudí/potkanov má komplexný charakter.

Experimenty na bunkových kultúrach sú v tomto projekte plánované, ale keďže sa jedná hlavne o sledovanie vplyvu liečiv na celú obličku a organizmus ako celok, z hľadiska fyziológie/farmakológie, tento druh štúdií ani nie je úplný. Tu je síce možné sledovať a ovplyvňovať signálne dráhy v jednotlivých renálnych bunkách, ale keďže oblička obsahuje mnoho rôznych typov buniek, ktoré sú vzájomne prepojené je potrebné pozrieť sa na problematiku IRI a IDO terapie v širšom kontexte; zahrnúť možný vplyv ďalších systémových elementov. Jedná sa o zistenie účasti možných regulačných proteínov a preto v tomto type projektu nie je možné použiť ani počítačové simulácie.

2. Redukcia počtu zvierat:

Na skúmanie protektívneho účinku liečiv je potrebných 8 experimentálnych skupín a 4 časové schémy:

1) kontrola (SHAM), **2)** IRI + vehikulum, **3)** IRI + 1-L-MT (100mg/kg), **4)** IRI + 1-D-MT (100mg/kg), **5)** IRI + 1-DL-MT (100mg/kg), **6)** IRI + Kynurenín (50mg/kg), **7)** IRI + minocyklín (20mg/kg) **8)** IRI + INF-gama (50 µg/kg), časové schémy: 12, 24, 48, 72 hodín reperfúzia.

Projekt plánujeme realizovať v 4 fázach:

1. fáza – 12 hodín reperfúzia
2. fáza – 24 hodín reperfúzia
3. fáza – 48 hodín reperfúzia
4. fáza – 72 hodín reperfúzia

Z našich predošlých experimentov vieme, že rozsah poškodenia obličiek po IRI je značne variabilný. Aby bolo možné experiment následne štatisticky správne vyhodnotiť, preto je nutný väčší počet zvierat v jednotlivých skupinách, ako pri iných experimentoch.

Príloha II

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

Názov projektu: - 990/16 - 121

TRAKTOGRAFIA A MAGNETICKÁ REZONANČNÁ SPEKTROSKOPIA NA ANIMÁLNYCH MODELOCH HĽADÁ NOVÉ BIOMARKERY SKORÝCH ŠTÁDIÍ DEMENCIE ALZHEIMEROVHO TYPU (VEGA 1/0414/16)

a) Ciele projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

Cieľom projektu je identifikovať nové *in vivo* biomarkery skorých a pokročilých štádií neurodegenerácie mozgu, ktoré budeme skúmať na metabolickom zvieracom modeli demencie Alzheimerovho typu (AD) pomocou *in vivo* magnetickej rezonancie (MR) a *in vitro* NMR metabolomikou. Degenerácia mozgu sa prejavuje poškodením mikroštruktúry bielej hmoty, ktorá je viditeľná v obrazoch difúzneho tenzoru (DTI), ako aj zmenami v metabolickom profile i energetickom metabolizme, ktoré môžeme kvantifikovať *in vivo* vodíkovou a fosforovou spektroskopiou (MRS). MR merania budú doplnené behaviorálnymi testami a kvantifikáciou senilných plakov na MR mikrozobrazení *ex vivo*. Súčasťou projektu je sledovanie vplyvu dvoch typov neuroprotektív na liečbu neurodegenerácie. Pomocou odozvy na zvolenú terapiu sa pokúsime objasniť mechanizmy v etiologicky rôznych typoch AD demencie, ktoré metabolický a metabolicko-ischemický model predstavujú. Získané výsledky majú potenciál stať sa dobrým východiskom pre nové terapeutické stratégie v humánnej medicíne. V dôsledku sledovania zvierat metódami *in vivo* a získania veľkého množstva nezávislých parametrov budeme používať MINIMÁLNY počet zvierat v danom súbore. Avšak pre publikovanie v odbornej tlači je nutná korelácia *in vivo* MR štúdií s *in vitro* meraniami, a preto v každom súbore experimentov plánujeme použiť 10 zvierat (z nich 5+5 bude korelovaných v rámci rôznych *in vitro* štúdií). Celkovo budeme realizovať 4 štúdie do konca roku 2018, na ktoré budeme potrebovať $10 \times 3 \times 4 = 120$ zvierat, potkanov kmeňa Wistar. Výsledky *in vivo* a *in vitro* dát budú dávané do vzájomnej súvislosti s cieľom získania nových, originálnych biomarkerov na skorú diagnostiku a terapiu sporadickej demencie AD-typu.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Replacement (nahraditeľnosť zvierat)

V uvedenom pokuse je potrebné získať komplexné informácie nových biomarkerov skorých štádií sporadickej formy demencie AD-typu a o možných terapeutických účinkoch testovaných látoch hodnotením mikroštruktúry mozgu, pomocou DTI, neurochemického profilu, energetických zmien a behaviorálneho testovania potkanov. Pokus nie je možné realizovať v podmienkach *in vitro*, je potrebné ho uskutočniť *in vivo*. Rovnako nie je možné pokus vykonať na systematicky nižšom druhu živočíchov. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Neurodegeneration Neurotoxicity Study (EPA, 1998) a OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Draft Proposal for a New Guideline 426, Neurodegeneration Neurotoxicity Study (OECD, 1995) odporúčajú štúdie neurodegenerácie a ich odozvy na terapiu vykonávať na laboratórnych potkanoch, pretože tieto predklinické testy sú pri úspešnosti na zvieratách vhodné pre humánnu medicínu.

Reduction (znižovanie počtu zvierat)

Reprodukateľné výsledky je možné získať len pri spracovaní dostatočného počtu zvierat. K zvieratám s modelovanou demenciou ako aj preliečovaným zvieratám je nutné priradiť kontrolnú skupinu zvierat, teda zdravých zvierat neliečených za účelom zistenia možného pozitívneho pôsobenia

liečiva a negatívneho pôsobenia látok spôsobujúcich sporadickú demenciu. V štúdií celkovo použijeme 120 samcov potkanov Wistar. Ide o najnižší možný počet zvierat v jednotlivých skupinách, ktorý môže byť štatisticky hodnotiteľný (10 na skupinu v prípade *in vivo* štúdií a 5 v prípade *in vitro* experimentov).

Refinement (zjemnenie pokusu)

S cieľom minimalizovať stres u zvierat, budú pri experimente prítomné len osoby nevyhnutné na vykonanie samotného pokusu, ktoré budú k zvieratám pristupovať veľmi šetrne. Počas celého priebehu experimentu bude o zvieratá náležité postarané, budú ošetrované odbornými pracovníkmi experimentálneho zverinca [REDACTED] a pravidelne kontrolované vedúcim experimentu. Pri ošetrovaní experimentálnych zvierat bude dodržiavaná každá z piatich slobôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Dospelé zvieratá budú umiestnené v klietkach po 5 jedincov. Prostredie vo vaniciach im bude obohatené o vhodné hračky. Po meraní a prebudení z narkózy budú zvieratá vrátené do domovskej klietky. Zdravotný stav zvierat bude denne monitorovaný. Zvieratá budú pri použitých testoch minimálne vystavené stresu a bolesti.

Spätne posúdenie - nie

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Cerebrospinálny mok kontaktujúce neuróny (CSF-cNs) a ich úloha v mieche cicavcov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 1/0635/16 – 808/16 – 221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):

miecha, cerebrospinálny mok kontaktujúce neuróny, vývin, regenerácia, potkan

Účel projektu*: Základný výskum

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

Cerebrospinálny mok kontaktujúce neuróny (CSF-cNs) tvoria zvláštnu skupinu neurónov v CNS. Nachádzajú sa v stene komorového systému mozgu a centrálného kanála miechy. V porovnaní s inými typmi neurónov ostáva biológia, vlastnosti a funkcia týchto buniek z veľkej časti neznáma. Údaje získané z experimentov na nižších stavovcoch potvrdzujú účasť týchto buniek na regeneračných procesoch po poškodení miechy. Hlavným cieľom predkladaného projektu je zodpovedanie dôležitých otázok týkajúcich sa vzniku, fenotypu, chemizmu a úloh CSF-cNs v mieche potkana počas vývinu a v regeneračných procesoch po jej poškodení. Získané odpovede pomôžu pri pochopení biológie, vlastností, funkcií a potenciálu týchto buniek.

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

Vzhľadom na to, že CSF-cNs u cicavcov nie sú doposiaľ preskúmané výsledky výskumu majú jednak charakter základného výskumu, ale môžu prispieť aj z klinického hľadiska v oblasti terapie poškodeného nervového tkaniva. Objasnenie funkcie a prípadný podiel na regeneračnej kapacite nervového tkaniva CSF-cNs môže posunúť pohľad na regeneračné procesy a terapiu poškodenia CNS, či už v smere využitia týchto buniek, alebo nutnosti hľadania inej cesty.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

laboratórne potkany, kmeň Wistar, 45 dospelých samcov, 24 dospelých samičiek, 72 mláďat v rôznom veku a 132 embryí v rôznom veku (počet mláďat a embryí je odhadovaný, nedá sa presne určiť)

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

Operovaným zvieratám bude v narkóze urobená laminektómia v Th13 a poranenie bude urobené formou unilaterálnej incízie injekčnou ihlou (18G) do oblasti vstupu zadných koreňov miechy do hĺbky 1,5 mm. Zvieratám bude ošetrovaná operačná rana a podané analgetikum a antibiotikum. Po takomto zásahu sa zvieratá zotavia do jedného dňa a prežívajú bez komplikácií.

Zvieratá budú priebežne sledované a v prípade zhoršenia zdravotného stavu (zápalová reakcia) im bude poskytnutá primeraná liečba.

Predpokladaná úroveň krutosti:

1. skupina zvierat stupeň krutosti: bez možnosti zotavenia
2. skupina zvierat stupeň krutosti: stredný

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Nahradenie experimentálnych zvierat nie je možné vzhľadom na charakter experimentu. Vývinové procesy je nutné sledovať v súvislostiach, t.j. in situ, lebo inak je nie možné popísať skutočné udalosti odohrávajúce sa počas embryonálneho a včasného postnatálneho vývinu cicavcov (v našom prípade potkanov). Reakciu poškodeného tkaniva miechy je nutné sledovať in vivo, vzhľadom na to, že takéto poškodenie sa nedá nijak inak simulovať, na reakcie poškodenej oblasti tkaniva má veľký vplyv okolité niche aj celkové procesy v organizme (napr. imunitný systém) Experimenty sa nedajú robiť na bunkových kultúrach ani na nejakých nižších živočíchoch, lebo je nutné brať do úvahy nielen ontogézu ale aj fylogenetické rozdielnosti.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet zvierat sme zvolili z ohľadom na nutnosť získané poznatky vyhodnotiť použitím vhodných štatistických metód. Aby mohli byť výsledky objektívne a hodnoverné je nutné použiť výbredný kmeň zvierat a embryá musia byť odobraté od rôznych matiek a rôznych otcov, aby neboli výsledky ovplyvnené nejakým znakom vyskytujúcim sa u súrodencov, resp. príbuzných zvierat.

3. Zjemnenie:

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

V našom zvieratníku majú experimentálne zvieratá komfortné podmienky ustajnenia, ktoré nevyvolávajú zvieratám zbytočný stres. Veľkosť kliek, počet zvierat v klieke, svetelný a kŕmny režim je optimálne prispôsobený potrebám našich experimentálnych zvierat, potkanov. Zvieratá majú zabezpečený zdravotný dohľad veterinárnym lekárom. Pravidelne sú klieky čistené, pracovníkom, ktorý so zvieratami zaobchádza šetrne.

V našom experimente nebude na 1. skupine zvierat vykonávaný žiadny zásah. Zisťovanie brezosti sme zjednodušili len vážením zvierat po uplynutí troch dní od pripustenia, odstránili sme doteraz používané sledovanie výterov z pošvy na prítomnosť spermii. 2. skupina zvierat kde budeme sledovať poškodenie miechy bude po zákroku ošetrená podaním protizápalových liečiv a liečiv tlmiacich bolestí. Zárok je volený tak, aby vyvolal čo najmenšie nutné poškodenie a zvieratá sa po takomto zásahu veľmi rýchlo zotavujú. Počas celej doby experimentu budú pod dohľadom veterinárneho lekára.

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