

Príloha 2 :

Netechnické zhrnutie projektu

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

Názov projektu: Vplyv chitosanu, hyaluronanu sodného, antioxidantu Mito Q a ich kombinácie na hojenie ischemických rán u králikov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2264/16 - 221

Kľúčové slová: ischemická rana, membrána, králik, chitosan, hyaluronan, Mito Q

Účel projektu:

- základný výskum s cieľom liečby chorôb, poškodenia zdravia človeka, testovania kvality a účinnosti nových zdravotných prostriedkov pri ťažko sa hojajúcich pooperačných ranách v humánnej medicíne.

Ciele projektu

Cieľom štúdie je určiť a porovnať efekt monoterapie membránami obsahujúcimi samotný chitosan, hyaluronan sodný, antioxidant Mito Q i kombinovanej liečby kombináciou všetkých látok na proces hojenia chronických ischemických rán u králikov.

Prínos z vykonaného projektu:

Predpokladaným prínosom bude získanie nových originálnych poznatkov o účinku testovaných látok v monoterapii i kombinovanej liečbe na proces hojenia chronických ischemických rán u králikov. Poznatky získané z predkladaného projektu budú takisto podkladom pre vývoj nových a bezpečných zdravotníckych prostriedkov v humánnej medicíne.

Druh použitých zvierat a ich predbežné počty:

V postupe sa použijú králiky vo veku 15 – 16 týždňov, s telesnou hmotnosťou v rozsahu 2000 – 3000 g. Počet 40 zvierat postačuje pre stanovenie účinnosti testovaných látok na hojenie ischemickej rany a porovnanie ich terapeutických vlastností s negatívnou kontrolou.

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

Králiky sa podrobia operácii v celkovej i lokálnej anestézii, ktorá je nutná pre indukciu modelu chronickej ischemickej rany a vychádza z predpokladaného spôsobu užívania zdravotníckeho prípravku pri liečbe vulnusu. Pri preväzovaní a meraní rán budú experimentálne jedince v čiastočnej anestézii fixované vo fixačných boxoch. Pooperačný stav a doba pozorovania 15 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetík.

Predpokladáme, že ujma na použitých králikoch bude len v prvých dvoch dňoch po operácii, kedy sa hojí incízne poranenie. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním čiastočnej, resp. celkovej anestézie a dennou aplikáciou analgetík. Z hľadiska bezpečnosti budúceho zdravotného prostriedku pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Postupy vykonávané na zvieratách budú **strednej** úrovne krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov.

Súlad s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Nahradenie (replacement)

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania hojajich vlastností látok na modeli chronickej ischemickej rany. Preto sa používa klasická *in vivo* metóda. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

Obmedzenie (reduction)

Aby výsledky sledovania procesu hojenia mali určitú výpovednú hodnotu, musí sa použiť dostatočný počet zvierat. Osem zvierat (na 1 látku) je optimálny počet potrebný pre zistenie terapeutической efektivity testovaných látok, porovnanie ich účinkov navzájom a nemôže byť redukovaný. Použijú sa len samci králikov.

Zjemnenie (refinement)

Nakoľko pri testovaní liečebných vlastností látok na modeli ischemických rán sa vyžaduje operačný postup, v ktorom dobrý zdravotný stav a dobrá kondícia zvierat hrajú veľmi dôležitú rolu, starostlivosti o králiky ako i manipulácii s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými zaškolenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Postupy používané pri aplikácii membrán majú strednú úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu, preto bude zvieratám podaná celková i lokálna anestézia pri operácii s následnou aplikáciou analgetík, ktoré sa budú ďalej podávať denne počas trvania štúdie. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhoročnou praxou.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha II

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

Názov projektu: 2265/16-221

Ochrana mechanizmov modulujúcich permeabilitu endotelu v srdci.

Kľúčové slová v projekte

Vaskulárny endotel, endotoxín, srdce, produkty metabolizmu kvasiniek

Účel projektu: Základný výskum.

1a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, o počte a pých zvierat, ktoré sa použijú

Cieľom projektu je štúdium molekulárnych mechanizmov regulujúcich permeabilitu endotelu a možnosti ich ochrany pred poškodením vyvolaným bakteriálnym endotoxínom s produktami metabolizmu kvasiniek s protizápalovými vlastnosťami. V postupe nadväzujeme na náš predchádzajúci projekt schválený ŠVPS SR. Zdravým potkanom sa bude jednorazovo aplikovať intraperitoneálne roztok bakteriálneho endotoxínu (*Escherichia coli*, LPS, komerčný preparát) v dávke 1 mg/kg hmotnosti. LPS sa nechá pôsobiť 10 dní, čím sa snažíme navodiť experimentálny model doznievajúceho zápalu. V dôsledku aplikácie endotoxínu je možný výskyt lokálneho zápalu resp. malátnosti zvierat v prvých dňoch, pričom môžu zvieratá pociťovať krátkodobý diskomfort, ktorý nenaruša významne ich pohodu ani celkový stav. Počas doznievania zápalového procesu experimentálne zvieratá prejavujú záujem o krmivo a sú aktívne. V odbornej literatúre sa uvádza, že účinky endotoxínu závisia od použitej dávky, opakovania a spôsobu aplikácie, ako aj doby jeho pôsobenia. Hlodavce sú, na rozdiel od človeka, na endotoxín oveľa rezistentnejšie.

V postupe budeme používať produkty metabolizmu kvasiniek. Pri príprave a použití biomasy z kvasiniek *Rhodotorula glutinis* s obsahom karotenoidov budeme používať rovnaký postup ako v predchádzajúcom projekte schválenom ŠVPS SR. Budeme testovať aj vplyv pulcheriminu izolovaného z kultivačného média pri kultivácii kvasiniek *Metschnikowia pulcherima*. Aby sme vybrali najnižšiu možnú aktívnu koncentráciu pulcheriminu, ktorá by neohrozovala zdravie a život experimentálnych zvierat, budeme najprv skúmať v podmienkach *in vitro* koncentračnú závislosť vplyvu pulcheriminu na inhibíciu rastu baktérie citlivej na *M.pulcherima*.

Produkty metabolizmu kvasiniek budú aplikované experimentálnym zvieratám sondou gavážovaním do žalúdka. Pri projekte nepredpokladáme výraznejšiu ujmu na zdraví experimentálnych zvierat. Postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo ich utrpenie, bolesť a strach. Zvieratá budú chované počas celého pokusu za štandardných podmienok podľa Nariadenia vlády č.377/2012 a podľa vyhlášky MPRV SR č.436/2012 Z.z.. V zmysle Klasifikácie krutosti postupu, Oddiel I: Kategórie krutosti a Oddiel II: Kritériá zaradenia do kategórií podľa zákroku a manipulácie so zvieratom je možné ich zaradiť do kategórie krutosti „stredná krutosť“.

V pokuse použijeme 384 laboratórnych potkanov samcov kmeňa Wistar s hmotnosťou 220-250 g.

Štúdium mechanizmov, regulujúcich endotelovú bariérovú funkciu počas zápalového procesu prispeje k detailnejšiemu poznaniu mechanizmov prispievajúcich k vzniku aterosklerózy a ischemického ochorenia srdca. Hľadanie možností ochrany funkcie srdca a ciev s novými prírodnými substanciami s protizápalovými vlastnosťami je stále aktuálne a biotechnologické prístupy môžu nájsť uplatnenie aj v klinickom manažmente aterosklerózy.

1b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

V medzinárodných databázach a databázach medzinárodných patentov (ECVAM, CAAT systemic review, www.google.com, Altweb: Alternatives to Animal Testing, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, www.patents.com, ALTBIB – Alternatives to Animal Testing, New Technologies as Alternatives to Animal Testing,) sme hľadali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Fenotypová heterogenita endotelu závislá od typu a veľkosti ciev v srdci neumožňuje v našom projekte nahradiť animálny model alternatívnymi metódami, ktoré by nahradili podmienky v *in vivo* modeloch.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu, bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita postupu pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich štatistické vyhodnotenie.

Zásada zjemnenia (refinement)

Potkany v priebehu pokusu prežívajú stres, ktorý bude minimalizovaný šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia kliečky predmetní na hru a ohryzovanie. Pri injekčnej aplikácii LPS aj anestetika sa budú používať sterilné ihly a so zvieratami sa bude šetrne a ohľaduplne zaobchádzať. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii, vyvolanej tiopentalom v dávke 50-60 mg/kg. Postupy sú navrhnuté tak, aby sa minimalizovalo ich utrpenie, bolesť a strach. Počas celého postupu budú zvieratá pod dohľadom skúsených a školených pracovníkov, ktorí budú dodržiavať humánne postupy v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o zvieratá.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Bratislava, 05.05. 2016

Príloha č. 2 : 2208/16-227

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

Názov projektu:

Ovplyvnenie molekulových dráh glukolipototoxicity novým karboxymetylovaným merkaptotriazinoindolovým inhibítorom aldo-ketoreduktázy AKR1B1 v diabete, zápale a vekom podmienenej neurodegenerácii

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

Podstatou projektu je štúdium možnosti farmakologického využitia inhibítorov aldózareduktázy na báze substituovaných 1-indolactových kyselín pri prevencii a liečbe diabetických komplikácií. Budú testované nové zlúčeniny s očakávanou schopnosťou inhibovať enzým aldózareduktázu. Návrh nových štruktúr na báze substituovaných 1-indolactových kyselín, bude spočívať v počítačovej selekcii vhodných farmakofórových fragmentov potrebných pre interakciu s inhibičným väzobným miestom enzýmu. Očakávaným prínosom projektu bude vývoj vysoko účinných látok farmakologicky využiteľných v prevencii a liečbe chronických diabetických komplikácií i zápalu, s cieľom znížiť morbiditu ako aj mortalitu diabetikov, resp. zlepšiť kvalitu ich života.

V časti projektu *in vitro* sa použije celkom 324 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa ZDF). Experimentálnym jedincom pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami.

V časti projektu *in vivo* sa použije celkom 300 jedincov (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Zucker diabetic fatty). Experimentálny diabetes mellitus u ZDF potkanov sa vyvolá dlhodobým skrmovaním modifikovanej vysokoenergetickej kompletnej krmnej zmesi (KKZ). Po druhom mesiaci sa budú sledovať symptómy cukrovky. Pri zistení polyúrie sa odoberie krv z chvosta zvierat a stanoví sa hladina glukózy glukometrom. Potkany s hodnotou glukózy >20 mmol/L budú považované za diabetické. Kontrolným a diabetickým zvieratám v liečených skupinách budú po dobu 5, resp. 60 dní podávané každý deň testované zlúčeniny pracovníkom s dlhodobou praxou sondou do žalúdka.

Potkany sa podrobia len manipulácii pri aplikácii látok počas štúdie. Doba podávania je 5 dní v krátkodobom postupe, resp. 60-dní pri dlhodobom experimente.

Predpokladaná ujma na použitých zvieratách bude len v diskomforte pri fixácii potkanov a perorálnej aplikácii substancií. Samotný úkon však bude krátkodobý nespôsobujúci dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i analgetík. Pre zistenie bezpečnosti a účinnosti testovanej látky s plánovaným využitím pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych potkanov.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)

Rozhodujúca časť projektu bude realizovaná v podmienkach *in vitro*, kedy nebudú experimentálnym zvieratám pred usmrtením aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované substancie neprídu do kontaktu so živými potkanmi. V postupoch *in vivo* sa bude testovať len obmedzený počet najúčinnjších derivátov z postupov *in vitro*. Aby sa zmiernilo utrpenie zvierat, použije sa len krátkodobý postup *in vivo* v celkovej dĺžke 5 dní. Dlhodobý

experiment, kde sa otestuje efekt chronického liečenia, sa uskutoční v dĺžke 60 dní a nepredpokladá sa utrpenie potkanov počas jeho realizácie. Nutnosť realizácie postupov hodnotiacich účinkov novosyntetizovaných látok na experimentálnych jedincoch podporuje aj skutočnosť, že sa jedná o komparatívnu štúdiu biologickej aktivity viacerých zlúčenín. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre komplexnosť procesov absorpcie, distribúcie a metabolizácie liečiv v živých organizmoch nie je možné v projekte nahradiť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami.

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 fyziologické, biochemické, makroskopicko-morfologické analýzy, ako aj ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia v karanténe: po dobu 7 dní budú umiestnené po dvoch v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 53x32x19 cm, plocha 1670 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a krmného režimu. Budú v kontakte len so školenými pracovníkmi zverinca. Potkany počas postupu prežívajú stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním i obohatením prostredia vanice predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri odbere krvi z chvostovej žily sa stres zmierni používaním tenkých jednorazových ihliel, šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokoj celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Príloha č. 2 :

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

Názov projektu: 2023/16 -221

Molekulové modelovanie, syntéza a biologická aktivita substituovaných pyridoindolov v prevencii diabetických komplikácií

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

Podstatou projektu je štúdium možnosti farmakologického využitia inhibítorov aldózareduktázy na báze substituovaných 1-indolctových kyselín pri prevencii a liečbe diabetických komplikácií. Budú navrhnuté, syntetizované a testované nové zlúčeniny s očakávanou schopnosťou inhibovať enzým aldózareduktázu. Návrh nových štruktúr na báze substituovaných 1-indolctových kyselín, bude spočívať v počítačovej selekcii vhodných farmakofórových fragmentov potrebných pre interakciu s inhibičným väzobným miestom enzýmu. Očakávaným prínosom projektu bude vývoj vysoko účinných látok farmakologicky využiteľných v prevencii a liečbe chronických diabetických komplikácií a zápalu, s cieľom znížiť morbiditu a mortalitu diabetikov a zlepšiť kvalitu ich života.

V časti projektu *in vitro* sa použije celkom 324 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar). Experimentálnym zvieratám pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami.

V časti projektu *in vivo* sa použije celkom 300 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samcov, kmeňa Wistar). Experimentálny diabetes sa navodí i.p. podaním streptozotocínu [STZ, 30 mg/kg] v troch po sebe nasledujúcich dňoch. Tento spôsob je šetrnejší a menej bolestivý ako jednorazové i.v. podanie STZ v dávke 50 mg/kg, ktoré je navyše spojené s 25 % mortalitou. Kontrolným a diabetickým zvieratám v liečených skupinách budú po dobu 5 (60) dní (t.j. 6. až 10. deň), resp. 6.-65. deň od začiatku postupu podávané každý deň testované zlúčeniny pracovníkom s dlhodobou praxou sondou do žalúdka.

Potkany sa podrobia intraperitoneálnemu podaniu streptozotocínu a manipulácii pri aplikácii látok počas štúdie. Doba podávania STZ je 3 dni a substancií 5 dní v krátkodobom postupe, resp. 60-dní pri dlhodobom experimente.

Predpokladaná ujma na použitých zvieratách bude len v prvých troch dňoch pri použití streptozotocínu a v diskomforte spôsobenom fixáciou potkanov pri perorálnej aplikácii substancií. Samotné úkony však budú krátkodobé nespôsobujúce dlhodobú bolesť, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i analgetík. Pre zistenie bezpečnosti a účinnosti testovanej látky s plánovaným využitím pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych potkanov.

b) Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Zásada nahradenia živých zvierat (*replacement*)

Rozhodujúca časť projektu bude realizovaná v podmienkach *in vitro*, kedy nebudú experimentálnym zvieratám pred usmrtením aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami. V postupoch *in vivo* sa bude testovať len obmedzený počet najúčinnjších derivátov z postupov *in vitro*. Aby sa zmiernilo utrpenie

zvierat, použije sa buď krátkodobý postup *in vivo* v celkovej dĺžke 10 dní. Dlhodobý experiment, kde sa testuje efekt chronického liečenia, sa uskutoční v dĺžke 65 dní a nepredpokladá sa utrpenie potkanov počas jeho realizácie. Nutnosť realizácie postupov hodnotiacich účinkov novosyntetizovaných látok na celých zvieratách podporuje aj skutočnosť, že sa jedná o komparatívnu štúdiu biologickej aktivity viacerých zlúčenín. V medzinárodných databázach DB –ALM ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) a NC3Rs (National Centre for the Replacement, refinement and Reduction of Animals in Research) sa nenachádzajú alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre komplexnosť procesov absorpcie, distribúcie a metabolizácie liečiv v živých organizmoch nie je možné v projekte nahradiť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami.

Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby nebol ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovateľnosť a validita postupu pre fyziologické, biochemické a morfológické analýzy a ich štatistické vyhodnotenie. Zvieratá budú rovnakého pohlavia, veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom.

Zásada zjemnenia (refinement)

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia karanténizované: po dobu 7 dní budú umiestnené po dvoch v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 53x32x19 cm, plocha 1670 cm²) za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Budú v kontakte len so školenými pracovníkmi zverinca. Potkany v priebehu postupu prežívajú stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia kliečky predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri injekčnej aplikácii STZ sa stres zmierni používaním tenkých jednorazových ihliel a šetrným a ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokéj celkovej anestézii.

Klasifikácia krutosti: 1. etapa - bez možnosti oživenia

2. etapa - stredná

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Netechnické zhrnutie projektu: - *po spätnom posúdení*

Názov projektu: Termovízia a natívne vyšetrenie moču potkanov ako neinvazívne prediktívne metódy na diagnostiku rôznych druhov karcinómov po ich chemickej indukcií.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-2616/14-221 *a*

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): natívna fluorescencia moču, termovízne vyšetrenie, rakovina pľúc, rakovina pažeráka, potkany kmeňa Sprague-Dawley

Účel projektu*: Základný výskum

Opísať ciele projektu:

Na rakovinu zomiera ročne viac ako desať miliónov ľudí, a preto je predovšetkým jej skorá diagnostika stredobodom záujmu. Hoci v klinickej praxi existuje množstvo diagnostických metód, iba niekoľko z nich je dostatočne senzitivných a špecifických na to, aby dokázali zachytiť rakovinu v jej včasnom štádiu vývoja, kedy je najlepšie prístupná liečbe. Dnešné metódy diagnostiky onkologických ochorení nie sú dostačujúce, nádor je často diagnostikovaný až vo vyšších štádiách, čo často znemožňuje účinný terapeutický zásah. Na rýchlu diagnostiku sú vhodné najmä techniky vyznačujúce sa čo najmenšou invazivitou. Jednou z potenciálnych diagnostických alternatív, vzbudzujúcou veľký záujem je fluorescenčná spektroskopia. Prirodzene fluoreskujúce látky sú metabolitmi mnohých významných metabolických dráh, typické najmä konjugovanými násobnými väzbami. Pre nádorové tkanivo je typická alterácia metabolizmu, vrátane metabolizmu natívnych fluorofórov, čím je ovplyvnená aj prirodzená fluorescencia biologických tekutín vrátane moču. Okrem vyšetrenia moču je jednou z neinvazívnych diagnostík aj termovízia. Termovízia alebo termovízne zobrazovanie je založené na teórii, že okolie najmä prsných, ale aj iných lokalizovaných nádorov, je teplejšie ako okolité tkanivá. Technika využíva infračervenú kameru na zachytenie „teplotných obrázkov“ na detekciu rakoviny. Termovízia je jednou z najnovších metód na štúdium diagnostiky nádorových ochorení, založenou na teórii zvyšujúcej sa teploty v potenciálnom mieste vzniku nádoru, kvôli zvýšenej miere angiogenézy a potenciálnemu zápalu.

Cieľom tohto projektu je analyzovať fluorescenčné matrice moču na prítomnosť aj nepredvídaných metabolitov, ktoré sú v súčasnosti perspektívnym nástrojom v diagnostike karcinómov prsníka, hrubého čreva a iných druhov rakoviny a sledovanie teplotných gradientov, zachytených termovíznou kamerou, meniacich sa v čase so vznikajúcimi a rastúcimi nádormi.

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

V súčasnosti stále pretrváva nedostatok klinických štúdií, zaoberajúcich sa natívnym vyšetrením moču onkologických pacientov a využitie termovízie pri diagnostike rakoviny je dokonca úplnou novinkou. Preto je tento fakt v centre záujmu vedeckej komunity. Výsledky nášho projektu budú slúžiť ako podklad pre klinickú diagnostiku karcinogenézy a zároveň obohatia doterajšie poznatky v tejto problematike o diagnostiku viacerých typov nádorového ochorenia.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny, kmeň Sprague-Dawley, samice (80ks) + samce (80ks)

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

V rámci projektu zvieratám indukujeme karcinogenézu, ktorá môže vyvolať u zvierat nepriaznivú ujmu v podobe mierneho stresu, resp. krátkodobej miernej bolesti. V prípade zväčšenia nádoru, u ktorého by vzniklo riziko krvácania a zároveň by u zvierat neboli pozorované zmeny v správaní spôsobené bolesťou, rozhodne vedúci projektu o preloženie do samostatnej kľetky s osobitnou záznamovou kartou a zároveň so zvýšenou ostražitosťou a pozornosťou, venovanou zvieratú. V prípade neočakávaného zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu rozhodne vedúci projektu o usmrtení zvieratá chloralhydrátom. Za súlad vykonávaného projektu je zodpovedný vedúci projektu.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Kategória krutosti: stredné, oddiel III, bod 2 d) modely s vyvolanými nádormi alebo so spontánne vzniknutými nádormi, pri ktorých sa očakáva, že spôsobia strednú bolesť alebo strach alebo že budú stredne prekážať normálnemu správaniu.

Uplatňovanie zásad 3R

Zásada nahraditeľnosti:

Nádorové ochorenia sú druhou najčastejšou príčinou úmrtí na celom svete. Dnešné metódy diagnostiky onkologických ochorení nie sú dostačujúce, nádor je často diagnostikovaný až vo vyšších štádiách, čo mnohokrát znemožňuje účinný terapeutický zásah. Na rýchlú diagnostiku sú vhodné najmä techniky vyznačujúce sa čo najmenšou invazivitou. Vzhľadom na charakter pokusu je nevyhnutné, aby bol experiment prevedený v podmienkach *in vivo*, ktoré tvoria systém dejov a odpovedí na stimuly z vonkajšieho a vnútorného prostredia. *In vitro* podmienky nikdy nevystihnú takú komplexnosť stimulov a dejov, ako je to v živom organizme. Moč zvierat predstavuje komplex metabolitov, ktoré sa postupne uvoľňujú v priebehu času a tým tvoria unikátnu tekutinu. Tak isto, vznikajúce nádory tvoria súbor rozličných buniek a ich meniacich sa línií a vytvárajú tak

mikroprostredie s meniacou sa teplotou a charakteristickými vlastnosťami. *In vivo* pokusy tvoria nepostrádateľný stupienok v predklinickom výskume. Projekt je zároveň naplánovaný tak, aby výsledky z neho mohli prejsť priamo do klinickej praxe.

Zásada zníženia:

Plánovaný experiment je zostavený tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvierat'a. Zároveň sa dbá o to, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich privezenia až po smrť.

Zásada zdokonalenia (zjemnenia):

Počas experimentu bude zabezpečená komplexná starostlivosť o zvieratá. Bežnú starostlivosť o zvieratá budú zabezpečovať laborantky, ktoré sú príslušne školené a poučené. Všeobecne sa dá konštatovať, že uvedené experimentálne postupy nespôsobia nepríjemný diskomfort pokusných zvierat a že ide o štandardné typy pokusov (bežne používané v špičkových vedeckých pracoviskách) v súlade s etickými požiadavkami. Je však potrebné rátať s nepriaznivou ujmou zvierat v podobe mierneho stresu. V prípade zväčšenia nádoru, u ktorého by vzniklo riziko krvácania a zároveň by u zvierat'a neboli pozorované zmeny v správaní spôsobené bolesťou, rozhodne vedúci projektu, [REDACTED], o preloženie do samostatnej kletky s osobitnou záznamovou kartou a zároveň so zvýšenou ostražitosťou a pozornosťou, venovanou zvierat'u. V prípade neočakávaného zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu rozhodne vedúci projektu o usmrtení zvierat'a chloralhydrátom. Za súlad vykonávaného projektu je zodpovedný vedúci projektu.

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

Netechnické zhrnutie projektu: 1382/16-221

Názov projektu: Vplyv cytostatickej liečby na dynamiku expresie faktorov spôsobujúcich liekovú rezistenciu u experimentálne navodeného karcinómu mliečnej žľazy.

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:

Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov): karcinóm mliečnej žľazy, lieková rezistencia, terapia, DOX, paklitaxel

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 genetiky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel, uvedie sa aký

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

Cieľom predkladaného experimentálneho projektu je:

1/ zmapovať expresiu vybraných proteínov - mechanizmov liekovej rezistencie v mliečnej žľaze zdravých zvierat – samíc potkanov kmeň Sprague-Dawley

2/ zistiť hladiny sledovaných proteínov v experimentálne navodenom karcinóme mliečnej žľazy

3/ sledovať dynamiku očakávaných zmien v hladinách proteínov liekovej rezistencie po terapii karcinómu mliečnej žľazy vybranými cytostatikami

Doteraz sme sa v literatúre nestretli s experimentom rovnakého alebo podobného zamerania. Predpokladáme, že naše výsledky by mohli byť užitočné a čiastočne aplikovateľné aj v humánnej onkologickej praxi pri výbere najvhodnejšej terapie karcinómu mliečnej žľazy.

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

Je známe, že cytostatická liečba u človeka, zvyšuje hladiny proteínov liekovej rezistencie, čím prispieva k zhoršovaniu odpovede na ďalšiu terapiu.

V súčasnosti sú najpoužívanejšími chemoterapeutikami karcinómu mliečnej žľazy antracyklíny, alkylačné látky (cyklofosamid), taxány, antimetabolity (5-fluorouracil, gemcitabin,...) a vinorelbin. My sme sa rozhodli v našom experimente použiť kombináciu doxorubicín (DOX) - paklitaxel. Táto kombinácia je dnes najčastejšie používaná pre dobré liečebné výsledky s predĺžením doby prežívania. Oba patria k novšej a účinnejšej generácii chemoterapeutík.

Pri terapii karcinómu mliečnej žľazy sa klinickí onkológovia riadia určenými protokolmi, ktoré závisia od istých kritérií. Je to v prvom rade celkový výkonnostný stav pacienta – *performance status*. Ďalej je to určenie histopatologických parametrov (typ nádoru, štádium ochorenia a

pod.). Zavedením ďalších nových kritérií pri výbere terapie by sa liečba mohla maximálne individualizovať s prihliadnutím na určujúce faktory liekovej rezistencie. Škála faktorov ovplyvňujúcich rezistenciu je veľmi široká, avšak nie všetky mechanizmy zohrávajú rovnakú úlohu pri navodení liekovej rezistencie. Z tohto dôvodu pokladáme za mimoriadne potrebné vytípať prioritné mechanizmy rezistencie pri karcinóme mliečnej žľazy a určiť nielen ich expresiu ale predovšetkým reakciu nádorových buniek na vybrané cytostatikum. Predpokladáme nárast expresie týchto proteínov a tým zvýšenie rezistencie na konkrétne liečivo. Keďže experiment, ktorý sme si vybrali nie je možné vykonať u človeka, zvolili sme si zvierací model. K myšlienke voľby potkaních samíc nás priviedlo zistenie, že u potkanov sa o problematike expresie nami vybraných proteínov vie veľmi málo. V literatúre sme sa vôbec nestretli so záznamom o MDR proteínoch (Pgp a MRP1), o expresii DNA reparačných proteínov (XRCC a ERCC) ani o karboanhydráze IX v karcinóme mliečnej žľazy potkana. V prípade proteínu survivinu sme našli celkovo 7 záznamov, z ktorých len 2 práce sa venovali expresii survivinu v chemicky indukovanom karcinóme mliečnej žľazy potkana. Bolo zistené, že podávanie rapamycínu výrazne znížilo expresiu survivinu a tým došlo k zvýšeniu apoptózy nádorových buniek. U ACI potkanov bolo dokázané, že navodenie oxidačného stresu znižuje hladiny survivinu počas iniciácie tumorigenézy oxidačným stresom. Obe práce sú vysoko aktuálne, pretože pochádzajú z rokov 2013 a 2014. Čo sa týka dynamiky nárastu týchto proteínov po chemoterapeutickej liečbe sme v literatúre nenašli žiaden záznam.

V ďalšom sa chceme zamerať na koreláciu imunohistochemickej expresie proteínov s expresiou mRNA týchto proteínov v periférnej krvi a zároveň budeme sledovať prípadnú dynamiku zmien v expresii mRNA.

Ideálne by bolo rozšíriť škálu cytostatík a porovnať ich vplyv na expresiu proteínov liekovej rezistencie. Podobne by bolo vhodné zamerať sa aj na iné mechanizmy spôsobujúce rezistenciu. Z časových a personálnych dôvodov nie je možné v tomto projekte obsiahnuť viacero cytostatík a proteínov.

Naším zámerom je zmapovať vybrané proteíny liekovej rezistencie v karcinóme mliečnej žľazy potkana, ďalej potvrdiť alebo vyvrátiť známu skutočnosť o indukcii proteínov negatívne ovplyvňujúcich liekovú rezistenciu chemoterapeutickou liečbou, konkrétne DOX a paklitaxelom. Z výsledkov predkladaného experimentu na zvieracom modeli by sme chceli vyvodiť závery, ktorými by sme sa priblížili humánnej klinickej praxi kde by naše výsledky mohli byť aspoň čiastočne využité.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), kmeň Sprague-Dawley, samice 139 kusov

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

Predpokladáme, že i.p. aplikácia MNU a nárast nádorov mliečnej žľazy nevyvolá silné bolestivé stavy. Nakoľko sa ale jedná o ortotopický model karcinómu mliečnej žľazy a intraperitoneálne podávanie cytostatík u liečených skupín môžu spôsobiť dlhodobější diskomfort zvierat. Aplikácia cytostatík u liečených skupín bude trvať maximálne 17 dní u poslednej skupiny.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Stredná (2. st.)

Uplatňovanie zásad 3R

1/ Nahradenie zvierat:

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

Použitie potkana ako experimentálneho zvierat'a považujeme za najvhodnejšie z hľadiska možného využitia získaných výsledkov následne u človeka. Bolo by možné použiť aj iný druh laboratórnych zvierat, čo by ale nevedlo k žiadnej podstatnej zmene čo sa týka utrpenia zvierat. Nie je možné získať relevantné výsledky u iných druhov živočíchov ako je hmyz a pod. alebo použitím bunkových kultúr. Tu by sme si nedovolili tvrdiť, že existuje úzka previazanosť biochemických pochodov a komplexnosť ako to je u vyšších organizmov.

U bunkových kultúr je problémom aj rast nádorových buniek v jednej vrstve (monolayer), pričom u človeka a živých vyšších organizmov je to stále rast nádorových buniek v niekoľkých vrstvách. To prirodzene podstatne ovplyvňuje aj prienik cytostatika do nádorovej bunky a jeho vplyv na rast nádoru.

2/ Redukcia počtu zvierat:

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

Z hľadiska experimentálneho výskumu je nutné zabezpečiť dostatočný počet zvierat so snahou o redukciu chýb, ku ktorým môže dôjsť v priebehu spracovania výsledkov. Zodpovedne sme pristupovali k výberu počtu zvierat a minimalizovali sme ho na najmenšiu možnú mieru. Naopak, výsledky, ktoré dosiahneme musia byť štatisticky hodnotiteľné a najmenší počet zvierat pre relevantné štatistické údaje by mal byť 5 kusov.

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)

Laboratórny potkan je už dlhodobo považovaný za veľmi vhodné modelové zviera pre pokusy v humánnej medicíne.

Odber biologického materiálu bude vykonávaný až po usmrtení zvierat'a. Zvieratá budú usmrtené letálnou dávkou Zoletilu inj., čo považujeme za humánnu spôsob usmrtenia spojený s minimálnym až zanedbateľným utrpením pokusných zvierat. Stres pre zviera však môže predstavovať samotná manipulácia s ním, a to pri vážení, i.p. podávaní plánovaných látok a pozorovaní (meraní) rastu nádorov. Napriek tomu neplánujeme pred týmito úkonmi použiť sedatívum v inj. forme, pretože tento úkon by spôsobil zvierat'u väčšiu ujmu a stres ako samotná manipulácia s ním.

Zvieratá budú ustajnené minimálne po dvoch v schválených vaniciach (kliebkach) s obohateným prostredím, starať sa o nich bude odborne vyškolený a skúsený personál. Na konci experimentu budú zvieratá usmrtené letálnou dávkou Zoletilu inj.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:

áno

nie