

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

Cieľ projektu

2491/17-221

Cieľom projektu je identifikácia molekulárneho mechanizmu rôznych antimikrobiálnych efektov steroidov na uropatogénne baktérie, čo má význam nielen pre možné odhalenie príčin a potenciálnych terapeutických cieľov u pacientiek s infekciami močových ciest, ale môže pomôcť odhaliť dôležité rozdiely u experimentálnych zvierat a ľudí, čo umožní lepšie modelovať ľudské metabolické poruchy na zvieratách. Náš projekt bude realizovaný výhradne na experimentálnych zvieratách (na samiciach, a po úspešnom zaučení sa mini-invazívneho modelu aj na samcoch), pretože je ich použitie jedinou možnosťou ako adekvátne pozorovať a popísať dané mechanizmy. Budeme kombinovať jednotlivé faktory takým spôsobom, ako sa to deje priamo u pacientov, hoci to nesporne zvyšuje variabilitu a komplikuje interpretáciu. Zároveň však znižuje riziko klinicky irelevantných výstupov, ktoré nie sú reprodukovateľné kvôli mnohým špecifickým faktorom ako je napr. genetické pozadie zvierat.

Predpokladaný prínos a ujma

Význam tejto práce spočíva najmä v kontexte zvyšujúcej sa antibiotickej rezistencie uropatogénov, kedy akákoľvek alternatívna alebo úplne nová liečba je viac ako vítaná. Tento projekt si kladie za úlohu zodpovedať otázku do akej miery ovplyvňujú steroidné látky priebeh UTI na *in vivo* zvieracích modeloch, vzhľadom na to, že výsledky *in vitro* experimentov využitie steroidov ako alternatívnu alebo aspoň doplnkovú liečbu UTI podporujú.

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie stredné. Pri týchto postupoch budú zvieratá pociťovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat. Navyše, počas všetkých invazívnych výkonov budú zvieratá uspaté a bude podaná aj analgézia na zabránenie vzniku bolesti a následne utrpenia.

1. Fáza

| Postup | Krutosť | Popis |
|---|---------|--|
| anestézia chirurgická | slabé | isofluran inhalačne pred samotnou aplikáciou baktérií, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| infekcia močových ciest transuretrálnym katétrom | stredné | zavedenie 100ul baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra neinvazívne, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| infekcia močových ciest mini-invazívnym prístupom | stredné | zavedenie 100ul baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra invazívne, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| aplikácia s.c. injekcie jednorazovo | slabé | zvieratá budú ešte v anestézii, podanie meloxicamu subkutánne |

| | | |
|--|---------|---|
| | | v dávke 0,5ml s.c. (analgetiká) po zavedení baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| váženie po 24h po infekcii | slabé | zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| prežívanie 48h | stredné | z iných aj našich experimentov vieme, že ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat. |
| usmrtenie – predávkovanie anestéziou, odber krvi, orgánov, atď | slabé | krátkodobá fixácia asi 10s-20s, podanie nadmernej dávky ketaminu+xylazínu i.p., zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |

2. Fáza

| Postup (časť A) | Krutosť | Popis |
|--|---------|--|
| anestézia chirurgická | slabé | isofluran inhalačne, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| operačný zákrok (ovariektómia, kastrácia, adrenalektómia, sham) ^a | stredné | zvieratá podstúpia operačný zákrok, v závislosti od skupiny sa realizuje sham operácia, alebo ovariektómia bilaterálna, orchiektómia bilaterálna alebo adrenalektómia, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| aplikácia s.c. injekcie jednorazovo | slabé | zvieratá budú ešte v anestézii, podanie meloxicamu subkutánne v dávke 0,5ml s.c. (analgetiká) po zavedení baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| rekonvalescencia | slabé | Sledovanie zdravotného stavu zvierat 2x denne v domácej kletke. Váženie á 24h, pri dosiahnutí end-pointov budú zvieratá vyradené z experimentu a usmrtené. |
| subkutánne podávanie injekcie opakovane | stredné | krátkodobá asi 20s trvajúca fixácia. Budeme 14 dní obdeň po lokálnej dezinfekcii aplikovať príslušné látky/hormóny podľa skupiny podkožne. Celkovo pôjde teda o 8 podaní . Miesto vpichu sa bude striedať na chrbte, ide |

| | | |
|---|---------|--|
| | | o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| anestézia pred zavedením baktérií do močového mechúra | slabé | isofluran inhalačne pred samotnou aplikáciou baktérií, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| infekcia močových ciest mini-invazívnym prístupom | stredné | miniinvazívna metóda na podanie baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra oboch pohlaví, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| usmrtenie predávkovanie anestéziou | slabé | krátkodobá fixácia asi 10s-20s, podanie nadmernej dávky ketaminu+xylazínu i.p., zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |

| Postup (časť B) | Krutosť | Vplyv na zvierat |
|--|---------|--|
| anestézia chirurgická | slabé | isofluran inhalačne, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| operačný zákrok (ovariektómia, kastrácia,) | stredné | zvieratá podstúpia operačný zákrok, v závislosti od skupiny sa realizuje sham operácia, ovariektómia bilaterálna alebo orchiektómia bilaterálna, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| aplikácia s.c. injekcie jednorazovo | slabé | zvieratá budú ešte v anestézii, podanie meloxicamu subkutánne v dávke 0,5ml s.c. (analgetiká) po zavedení baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| rekonvalescencia | slabé | Sledovanie zdravotného stavu zvierat 2x denne v domácej kletke. Váženie á 24h. Pri dosiahnutí end-pointov budú zvieratá vyradené z experimentu a usmrtené. |
| subkutánne podávanie injekcie | stredné | krátkodobá asi 20s trvajúca fixácia. Budeme 14 dní obdeň po lokálnej dezinfekcii aplikovať príslušné hormóny aj s ich blokátormi podľa skupiny podkožne. Celkovo pôjde o 8 podaní. Miesto vpichu sa bude striedať na chrbte, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| anestézia pred | slabé | slabé, isofluran inhalačne pred samotnou |

| | | |
|---|---------|--|
| zavedením baktérií do močového mechúra | | aplikáciou baktérií, zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |
| infekcia močových ciest mini-invazívnym prístupom | stredné | miniinvazívna metóda na podanie baktérií alebo fyziologického roztoku do močového mechúra oboch pohlaví, ide o postup, pri ktorom je pravdepodobné, že stredne narušia pohodu alebo celkový stav zvierat |
| usmrtenie predávkovaním anestéziou | slabé | krátkodobá fixácia asi 10s-20s, podanie nadmernej dávky ketaminu+xylazínu i.p., zvieratá budú pociťovať krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach |

Počet a typ zvierat

Druh použitých zvierat je *mus musculus* (myš domová). Počet použitých zvierat na celú dobu riešenia je 510 samcov kmeňa CD-1 a 540 samíc kmeňa CD-1.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Nahradenie

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť alterácie funkcie a štruktúry orgánov a následky terapeutických intervencií, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „in vivo“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádzajú pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu, navyše experimenty, ktoré by sa dali takto realizovať už realizované boli a nám uľahčili presnejší dizajn experimentu. V tomto štádiu ale pokusy musia byť realizované na myšiach. Na potkanoch ani iných zvieratách, nie je model močových infekcií zavedený, preto sa iné zvieratá nedajú použiť.

Obmedzenie

V experimentoch bude použitý minimálny možný počet experimentálnych zvierat, ktorý je potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím dvojfaktorového ANOVA testu s posthoc analýzami a zachovaní dostatočnej štatistickej sily. Model vykazuje variabilitu, ktorá predpokladá, že u cca. 20% zvierat budeme musieť akceptovať príliš vysokú alebo nízku detekciu kolonie formujúcich jednotiek, čo zvýši variabilitu a sťaží analýzu. Experimenty nebudú vykonávané naraz, v prípade, že variabilita bude nižšia ako uvedených 20%, použijeme menej zvierat na skupinu.

Zjemnenie

Zvieratá budú počas pokusov sledované priebežne, so záznamom každé 4h počas pracovnej doby. Po postupoch, t.j. po operačných zárokoch a zavedení baktérií, budú zvieratá na vyhrievanej podložke až do momentu zobudenia a sledované kontinuálne. Bolesť a utrpenie budú hodnotené podľa Sotocinala et. al 2011, hodnotenie aspoň 1x do dňa zapisované. Zvieratá v evidentnom distrese dostanú analgetikum Meloxicam 0,5mg/kg s.c. V prípade, že zvieratá budú vykazovať zvyšujúci sa distres, bolesť a/alebo utrpenie podľa nami navolených human end-pointov a napriek analgetickej

liečbe, bude zviera vyradené z experimentu. So zvieratami sa bude manipulovať jemne, budú mať prístup k vode aj potrave ad libitum, v kliebkach sú dostupné hračky.

Spätné posúdenie

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý má predpokladanú ujmu strednú, projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.

Príloha č. 2

Netechnické zhrnutie projektu:

Názov projektu: Funkcia neuropeptidov a ich receptorov pri regulácii prenosu

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2402/14-221

Kľúčové slová v projekte: neuropeptidy, kliešte, patogény

Účel projektu: Základný výskum

Ciele projektu:

Kliešte majú celosvetový význam ako rezervoáre a prenášače rôznych patogénnych mikroorganizmov (vírusy, baktérie, prvoky), ktoré vyvolávajú závažné ochorenia ľudí a zvierat. Štúdium prenosu patogénov medzi kliešťami a hosťiteľmi je možné jedine na *in vivo* systémoch a zahŕňa sledovanie nákazy hosťiteľa (stavovec) a nákazy kliešťov patogénmi v rôznych vývinových štádiách počas cicania na hosťiteľa, ako aj ich transštadiálneho či transvariálneho prenosu. Neoddeliteľnou súčasťou života kliešťov je cicanie krvi teplokrvných živočíchov, počas ktorého kliešte vylučujú do hosťiteľov prostredníctvom slín aj patogénne mikroorganizmy.

Najčastejšie kliešťami prenášané patogény sú *Borrelia burgdorferi* (ochorenie lymfická borelióza), *Rickettsia spp.* (ochorenia DEBONEL- Dermacentor-borne necrosis a TIBOLA-tick-borne lymphadenopathy) a TBEV (ochorenie kliešťová encefalitída).

Odozva organizmu na infekciu spomenutými patogénmi je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa faktorov, a práve preto sa v tomto prípade nedá *in vivo* nahradiť bunkovými kultúrami.

Prínos z vykonaného projektu:

Predkladaný projekt je zameraný na objasnenie úlohy vybraných neuropeptidov a ich receptorov pri prenose patogénov *R. helvetica*, *B. afzelii* a TBEV z kliešťov *I. ricinus* na hosťiteľské zvieratá. Predpokladané výsledky môžu slúžiť k lepšej ochrane proti prenosu patogénov a k vývoju účinných prostriedkov na potlačenie reprodukčnej schopnosti kliešťov ako nebezpečných ektoparazitov človeka a hospodárskych zvierat.

Výsledky pokusov vyhodnotíme štatistickými metódami a budeme prezentovať na vedeckých podujatiach a publikovať vo vedeckých a odborných časopisoch.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

Ako modelový organizmus použijeme laboratórne myši (BALB/c, C3H/N, BALB/c Nunu), ktoré budeme infikovať vybraným druhom borelie (*B. afzelii*), rickettsie (*R. helvetica*) a TBEV. Maximálny počet zvierat, ktoré sa v pokusoch použijú je 600 ks BALB/c myši, 200 ks C3H/N myši a 240 ks BALB/c Nunu. V údajoch o plánovaných počtoch zvierat je zahrnutý aj počet potrebný pre opakovanie niektorých pokusov. Počet myši je plánovaný na celé obdobie a bude sa robiť niekoľko rozličných experimentov. Opakovania pokusov sa však obmedzia na nevyhnutné minimum a budú slúžiť výlučne pre overenie sporných výsledkov a objektívne štatistické vyhodnotenia experimentov.

Na sledovanie funkcie neuropeptidov a ich receptorov v dospelých kliešťoch použijeme maximálne 20 králikov. Myš ako model nie je vhodný hositeľ pre dospelé kliešte.

V prípade rickettsií vyskytujúcich sa na Slovensku nie je z literatúry jasný zvierací model vhodný pre študovanie prenosu patogénov medzi kliešťami a hositeľmi. Z tohto dôvodu sa nedá jednoznačne napísať, ktorý druh myší je vhodný pre ktorý druh rickettsií, preto uvádzame maximálne počty použitých C3H/N a BALB/c Nunu myší.

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá vrámci vykonávania projektu:

Ujma spôsobená zvieratám z hľadiska utrpenia, bolesti a strachu je minimálna a odôvodnená vzhľadom k očakávaným výsledkom i s ohľadom na etické aspekty, nepredpokladáme výrazný nepriaznivý vplyv. Naše postupy sa snažia imitovať situáciu v prírode, z toho vychádzajú naše predpoklady. Aj voľne žijúce zvieratá sú vystavené cicaniu kliešťov a vzhľadom na imunomodulačné látky v slinách kliešťov ich cicanie nie je pre ne zaťažujúce. Cicanie kliešťov neobmedzuje zvieratá v pohybe ani v prírode, ani v našich postupoch. Neočakávame príznaky ochorenia na základe našich doterajších skúseností po infekcii s *B. afzelii* a *R. helvetica*. Zvieratá infikované cicajúcimi kliešťami s TBEV pri prvých príznakoch ochorenia (zhoršená koordinácia pohybov, apatia) humánne usmrtime. Z našich doterajších poznatkov humánne usmrtienie urobíme v čase, keď ochorenie nie je ešte naplno prejavené, a tým maximálne zamedzíme utrpeniu myší. Laboratórne zvieratá budú počas celého pokusu chované za štandardných podmienok podľa platnej normy EU, pričom sa budú rešpektovať základné etické princípy požadované pri zaobchádzaní s pokusnými zvieratami. Pri výskyte bolestivých stavov bude zvieratám podaný prípravok na zníženie bolesti (Paracetamol, 100-300 mg/ kg p.o.).

Predpokladaná úroveň krutosti:

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy, ktoré sa budú vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch, je možné zaradiť do kategórie „slabé“ až „stredné“.

Jednotlivé postupy, ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradíme do kategórie:

podávanie anestézie pri infikovaní myší (isoflurán) - „slabé“

podávanie anestézie pri usmrtení myší a králikov (isoflurán, thiopental) - „slabé“

biopsia z uší myší v lokálnej anestéze - „slabé“

jednorazová intraperitoneálna infekcia myší s *Borrelia afzelii* a *Rickettsia sp.* - „slabé“

cicanie kliešťov na myšiach a králikoch - „stredné“

umiestnenie myší počas cicania kliešťov po jednom v klietke - „stredné“

umiestnenie myší počas sledovania prežívania (21 dní) po jednom v klietke - „stredné“

infekcia myší s TBEV cez cicajúce kliešte - „slabá“

odber kliešťov pinzetou z myší - „slabé“

Uplatňovanie zásad 3R:

Nahradenie zvierat

Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods (<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu>) a The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (<http://iccvam.niehs.nih.gov>) analýza patogenézy infekcie spôsobenej testovanými patogénmi nie je možná bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model.

Redukciu použitia počtu zvierat predstavuje zároveň použitie iba troch druhov myší (BALB/c, C3H/N a BALB/c Nunu), nebudú použité i ďalšie druhy, napriek tomu, že nie je

doposiaľ známy zvierací model vhodný pre sledovanie prenosu rickettsií medzi vektormi a hosťiteľmi.

Zjemnenie

Možné strádanie a utrpenie zvierat bude minimalizované dodržiavaným piatich slobôd uvádzaných pri definícii welfare zvierat. Každodennú starostlivosť o zvieratá v postupoch bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia. V súlade s 3R zásadami sa počas celého postupu budú dodržiavať postupy maximálne zjemňujúce pokus. Pre laboratórne myši budú počas postupov vytvorené dobré životné podmienky, obmedzí sa ich bolesť, utrpenie, ako aj prípadná trvalá ujma na minimum. Zvieratá budú umiestené tak, aby mali vizuálny kontakt s ostatnými a budú mať obohatené prostredie (viac podstielky na stavbu hniezd, štvorce papierovej vaty, papierové valčeky)

Projekt nebude podliehať opätovnému posúdeniu.

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Test tumorigenicity 2466/17-22 1

Kľúčové slová: príprava vakcín, test tumorigenicity, MA104

Účel projektu: Aplikovaný výskum

Cieľ projektu: Overiť, že línia MA104 derivovaná z opičej obličky nemá tumorigénny potenciál.

Prínos projektu: Potvrdenie bezpečnosti línie umožní jej biotechnologické využitie.

Počet a druh použitých zvierat: 12 myší kmeňa Balb/c nu/nu

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu: Nepredpokladáme, že testovaná línia je tumorigénna, myši neutrpia ujmu okrem krátkodobého mierneho stresu spôsobeného individuálnym značením (tetovanie v lokálnej anestézii) a subkutánnym podaním bunkovej suspenzie.

Aj na priek tomu, že nepredpokladáme tumorigénnosť testovanej línie, zvieratá budú denne kontrolované pohľadom a dvakrát do týždňa pohmatom na prítomnosť nádorov. Nakoľko sa jedná o bezsrsté myši, prípadný rast nádorov by bol veľmi dobre viditeľný. Myši, u ktorých by sa vyskytol nádor väčší ako 1 cm³ by boli eutanazované. Rovnako by boli usmrtené myši so stratou hmotnosti nad 10% a myši so zhrbeným držaním tela, ktoré indikuje zhoršený zdravotný stav.

Predpokladaná úroveň krutosti: slabá

Súlad s požiadavkami „3R“

Nahradenie

Hlodavce v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov, experimentom na zvieratách predchádzali štúdie v *in vitro* podmienkach, v ktorých línia nevykazovala tumorigénny potenciál. Tento výsledok je však nutné overiť na *in vivo* modeli.

Obmedzenie

Na základe našich skúseností z predchádzajúcich projektov, údajov z vedeckej literatúry a požiadaviek zadávateľa sme počet zvierat minimalizovali tak, aby boli výsledky akceptovateľné.

Zjemnenie

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií (mäkké podložky pre fixáciu myši, asistencia ošetrovateľa, s ktorým zvieratá prichádzajú pravidelne do kontaktu). Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom budú eutanazované.

Spätné posúdenie projektu:

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie.

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Neuronálna plasticita u spevavcov

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2982/17-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): striatum, MRI, neurogenéza, spev, správanie

Účel projektu* : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

- Zistiť, či variabilita piesne súvisí s mierou neurogenézy a s rýchlosťou obnovy bazálnych ganglií (BG) po poškodení.
- Sledovať vplyv manipulácie neurogenézy na regeneráciu mozgu a správanie.
- Preskúmať schopnosť samíc diskriminovať zmeny vokálneho prejavu samcov s poškodenými BG.
- Určiť časové a priestorové zmeny v mozgu počas regenerácie BG a axonálneho spojenia zo striata do talamu.
- Určiť schopnosť regenerácie mozgového spojenia zo striata do talamu. Zistiť, či je táto regenerácia nevyhnutná pre vznik kóktania u jedincov s poškodeným striatom.
- Stanoviť časový mechanizmus génovej aktivácie a prežívanie novovzniknutých neurónov počas regenerácie BG.

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

Zvýšená neurogenéza v dôsledku lézie bola zistená u cicavcov aj u vtákov. U cicavcov však obnova striata po poškodení predstavuje maximálne 0,2-1 % v závislosti na type poškodených

neurónov, zatiaľ čo podľa našich výsledkov je obnova Area X v striate spevavcov takmer úplná. Nahradzovanie stratených alebo nefunkčných neurónov novými má potenciál v medicíne. Preto štúdiom mechanizmov tejto obnovy u spevavcov môže byť prínosom pri hľadaní stratégií možnej obnovy mozgu po poškodení.

V projekte ďalej zistíme, či a kedy sa nové neuróny zapoja do neuronálnych okruhov sprostredkujúcich spev, kedy je obnovená dráha z Area X do talamu a tiež kedy je obnovená génová expresia v motorickej dráhe. Na modeli spevavcov určíme, či nové neuróny navodzujú zmeny v piesni, ktorými sú napríklad zmenená rýchlosť spevu a zvýšené opakovanie niektorých slabík pripomínajúce koktanie.

Nemenej dôležitou súčasťou tohoto projektu je sledovanie regenerácie mozgu po poškodení prostredníctvom MRI. Technika *in vivo* zobrazovania magnetickej rezonancie MRI poskytuje veľmi cenné a kvalitné anatomické a štrukturálne informácie v živých systémoch. V závislosti od zvolených parametrov nastavených pri meraní dokáže MRI zviditeľniť rôzne vlastnosti meraného tkaniva, napríklad štruktúru orgánov, v našom prípade mozgu, na základe rôznych vlastností vody v ňom obsiahnutej (T1 a T2 vážené obrazy), perfúziu a difúziu tekutín (perfúzne a difúzne vážené obrazy – PWI a DWI), spojenie nervových dráh (traktografia) a mnohé iné. Ďalšou výhodou magnetickej rezonancie je jej neinvazívna povaha. To umožňuje opakované merania v čase na tom istom jedincovi, čo predstavuje novú dimenziu štúdia neurogenézy, ktorá sa vyvíja v dlhom časovom intervale. Veľký prínos predstavuje výskum magnetickej rezonancie *in vivo* na zvieracích modeloch, pretože umožňuje rôzne opakované merania, a tým dáva možnosť sledovať vývoj namodelovaného patologického stavu (v našom prípade lézie vytvorenej pomocou neurotoxínu) ako aj účinky zvolenej terapie. Už len samotná možnosť kontinuálnej kontroly obnovy mozgu predstavuje prínos z hľadiska technického (jednoznačné určenie polohy a veľkosti lézie od začiatku experimentu) aj etického (menšie množstvo použitých jedincov). Navyše v spojení s behaviorálnou analýzou umožnia tieto výsledky potvrdiť alebo vyvrátiť hypotézu o funkcii nových neurónov v regenerovanej Area X spevavcov pre kontrolu plynulého vokálneho prejavu.

Ďalším prínosom projektu je, že určíme fyziologickú relevantnosť zmien v speve po poškodení striata spevavcov. Zistíme, či samice vedia odlíšiť a preferujú niektorý typ piesne, či už pred alebo po poškodení striata. Zistíme tiež, či je ich výber ovplyvnený spevom otca.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebrička červenezobá (*Taeniopygia guttata*), 70 samcov a 55 samíc, z toho 15 samíc bude slúžiť len na indukovanie spevu a nebudú experimentálne ovplyvnené;
pestúnka japonská (*Lonchura striata domestica*), 40 samcov.

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

Nepriaznivý vplyv na zvieratá by mohla mať operácia alebo umelý spánok počas MRI meraní, aj keď podľa našej skúsenosti sa zebričky po operácii zotavujú pomerne rýchlo a niektoré jedince začnú spievať už po pár hodinách od operácie, čo je prejavom ich komfortu.

Niekoľkomesačná izolácia samcov vo zvukotesných boxoch môže mať nepriaznivý vplyv na psychiku.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Operácie a MRI budú vykonávané v celkovej anestéze, po ktorej zvieratá nadobudnú vedomie. Podávanie BrdU a EdU bude i.m. a blokátor mitózy bude podávaný prostredníctvom kanyly do mozgu. Tieto postupy sa klasifikujú ako „slabo kruté“ alebo „stredne kruté“. Letálnu dávku anestetika a dlhodobé umiestnenie samcov vo zvukotesných boxoch s prítomnosťou samičky 2 dni za týždeň klasifikujeme ako „stredne kruté“.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Metóda MRI umožňuje kontinuálne sledovanie lézie alebo obnovy mozgu u toho istého zvieratá, a teda ich počet je v porovnaní s použitím len histologických metód značne redukovaný. Navrhované počty zvierat zohľadňujú možnú variabilitu vo výsledkoch a tiež umožňujú štatistické vyhodnotenie.

Keďže pokus je primárne zameraný na sledovanie obnovy striatálnej časti mozgu po poškodení s perspektívou výstupu na človeka, nie je možné realizovať pokus na bunkových kultúrach. Alternatívne nahradenie vtáčieho modelu nižšími stavovcami alebo cicavcami tiež nie je možné, nakoľko zvýšená miera neurogenézy a obnova striata u týchto modelov nebola doteraz pozorovaná.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

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

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)

Zebrička červenozobá a v posledných rokoch aj pestúnka japonská sú výhodné pri štúdiu naučenej vokálnej komunikácie kvôli veľkosti, rýchlemu dospievaniu a rozmnožovaniu v zajatí, typu naučenej piesne, a tiež kvôli tomu, že sú u nich výborne popísané mozgové okruhy

kontrolujúce spev. Ich použitie v experimentoch je preto jasnou výhodou v porovnaní s použitím iných druhov učiach sa vokálne komunikovať, ako sú veľryby alebo papagáje (hlodavce túto schopnosť nemajú). Zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené strádaniu a utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach. Počas operácie budú uspaté zmesou kyslíka a izofluránu, ktorý umožňuje rýchlejšie prebudenie po operácii a aj lepšiu rekonvalescenciu než iné anestetiká. Počas operácie bude použitá výhrevná podložka udržiavajúca konštantnú teplotu zvieratá v anestéze. Po operácii budú jedinci umiestnení na pár hodín pod infračervené svetlo, ktoré umožní rýchlejšiu rekonvalescenciu. Pred poškodením kože na hlave použijeme Mesocain gél, pomocou ktorého môžeme znížiť celkovú dávku inhalačného anestetika. Pred transkardiálnou perfúziou bude zvieratám podaná letálna dávka izofluránu alebo tiopentalu, čím sa minimalizuje ich utrpenie na najnižšiu možnú mieru.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Príloha 2

Netechnické zhrnutie projektu

Názov projektu: Rozmnožovanie spevavcov pre pokusy

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 2982/14 - 221/3a

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): zebrička červenezobá, pestúnka japonská, spev, chovný pár

Účel projektu* : Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

- Získať dostatočný počet jedincov zebričky červenezobej a pestúnky japonskej pre následné experimenty.

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

Prínosom projektu je, že zvieratá potrebné pre uskutočnenie experimentov budú k dispozícii vo vhodnom čase a vo vhodnom veku. Najmä však, daní jedinci budú naučení pieseň, ktorá je pre daný experiment nevyhnutná. To sa dá docieľiť iba cieleným rozmnožovaním samcov s istým druhom piesne.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebrčka červenezobá (*Taeniopygia guttata*), 40 jedincov;
pestúnka japonská (*Lonchura striata domestica*), 20 jedincov;
odchovajú spolu 288 mlád'at

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

Krátkodobý diskomfort by mohli zvieratá zažiť pri nahrávaní spevu, keď sa ocitnú izolované v novom priestore. Spievať však začnú väčšinou na druhý deň po prenose, čo svedčí o ich dobrej pohode a habituácii.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Krúžkovanie a prenos medzi kliečkami a voliérou sa považuje za slabý stupeň krutosti. Nahrávanie spevu vo zvukotesnom boxe počas 3 dní, z toho 1 deň v prítomnosti samičky, sa považuje za stredný stupeň krutosti.

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Projekt rozmnožovania nemožno uskutočniť bez zvierat.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počty zvierat sú minimalizované a zároveň prispôbované tomu, aby bolo možné z daného počtu zvierat vybrať páry, ktoré si vyhovujú a uskutočniť rozmnožovanie.

3. Zjemnenie:

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

Zebrička červenezobá a pestúnka japonská sú používané pri štúdiu naučenej vokálnej komunikácie kvôli veľkosti, rýchlemu dospievaniu a rozmnožovaniu v zajatí, typu naučenej piesne, a tiež kvôli tomu, že sú u nich výborne popísané mozgové okruhy kontrolujúce spev. Ich použitie v experimentoch je preto jasnou výhodou v porovnaní s použitím iných druhov učiacich sa vokálne komunikovať, ako sú veľryby alebo papagáje (hlodavce túto schopnosť nemajú). Zvieratá počas samotného pokusu nebudú vystavené strádaniu a utrpeniu. Vodu a potravu budú mať k dispozícii *ad libitum*. Budú chované v štandardných podmienkach v párových kliečkach na rozmnožovanie alebo vo voliérach. V oboch priestoroch je prostredie obohatené konármi, bidielkami, hojdačkami, zvončekmi a podobne.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

NÁZOV PROJEKTU

Úloha extracelulárnej DNA v patogenéze a liečbe zápalových črevných ochorení

377/2012 Z.z. NARIADENIE VLÁDY Slovenskej republiky

§ 40 Netechnické zhrnutie projektu 304.1/14-221/B

CIEĽ PROJEKTU

Projekt vychádza z aktuálnych poznatkov o rôznych typoch extracelulárnej DNA a patogenéze zápalových črevných ochorení (ZČO). Vychádzame z predpokladu, že rôzne typy extracelulárnej DNA, či už bakteriálna, mitochondriálna alebo jadrová sú pri ZČO vyššie ako u zdravých jedincov a spolupôsobia pri multifaktoriálnej etiológii ZČO. V predkladanom projekte plánujeme postupne experimentálne overiť extracelulárne koncentrácie jednotlivých typov DNA v plazme a slinách experimentálnych zvierat trpiacich ZČO. Predpokladáme, že každý z typov extracelulárnej DNA by mohol prispievať k patogenéze ZČO. Vzhľadom na to, že zloženie bakteriálneho mikrobiómu pri ZČO sa do značnej miery líši od mikrobiómu zdravých jedincov a zároveň keďže na CpG ostrovčeky bohatá bakteriálna DNA stimuluje imunitnú odpoveď u ľudí, predpokladáme, že DNA, ktorá je uvoľňovaná z patogénnych baktérií má negatívne dôsledky na patogenézu ZČO. Zároveň, vzhľadom na rozsiahle chronické zápalové procesy v črevách pri ZČO dochádza v organizme k rozpadu buniek črevnej sliznice, čo by potenciálne mohlo byť zdrojom jadrovej a mitochondriálnej DNA. Použitím špecifických metód molekulárnej biológie budeme schopní odlíšiť a porovnať jednotlivé typy ecDNA a tým sledovať funkciu všetkých spomínaných typov.

SÚLAD ZÁSAD 3R

Dizajn pokusov, ako aj počet jedincov v skupinách bude vychádzať z dostupnej literatúry, ktorá je zameraná na podobné problémy (a tam je bežný počet $n=15$ na skupinu). Toto je dôležité pre porovnateľnosť výsledkov s inými dátami, ale aj z hľadiska dodržania pravidla 3R pre experimenty so zvieratami. Analýza predbežných dát napr. z behaviorálnych testov poukazuje na to, že veľkosť skupiny by pri sile testu 90% a sledovanej variabilite, resp. rozdieloch mala dosahovať až $n=100$ pri hladine významnosti 5%. Tento prístup, žiaľ, nie je možné aplikovať, preto sa budeme musieť držať zaužívaných postupov a veľkostí skupín.

Problém možnej falošnej negativity výsledkov sa budeme snažiť vyriešiť analýzou rovnakých veličín rôznymi testami, resp. metódami.

OČAKÁVANÁ UJMA A PRÍNOS

Tento projekt si kladie za úlohu objasnenie úlohy extracelulárnej DNA pri vzniku a priebehu ZČO a teda jeho prínos spočíva v príspevku k objasneniu patogenézy ZČO. Následne budú tieto poznatky využité k hľadaniu ďalších modalít terapie ZČO, ktoré su potrebné.

Zvieratá budú podstupovať úkony, patriace do kategórie stredné. Pri týchto postupoch budú zvieratá pociťovať krátkodobú strednú bolesť, utrpenie alebo strach, avšak tieto úkony vo významnej miere nenarušujú pohodu ani celkový stav zvierat. Navyše, počas všetkých invazívnych výkonov budú zvieratá uspaté a bude podaná aj analgézia na zabránenie vzniku bolesti a následne utrpenia.

Pri známkach stresu, bolesti alebo distresu, bude zvieratám podaný Meloxicam. Nie paušálne. Ak nezaberie analgetikum a stav zvierat sa bude zhoršovať, budú utratené. Utratené budú pri dosiahnutí viac ako 60% z maximálneho skóre, ktoré môžu dosiahnuť pri hodnotení podľa Sotocinala et al. 2011 (5 bodov z 8). Rovnako tak pri dosiahnutí iných bodov human-endpointov.

Human endpointy:

☒ dosiahnutie viac ako 4 bodov podľa skórovacieho systému Sotocinal SC et al: The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions, Mol Pain. 2011; 7: 55.

☒ strata telesnej hmotnosti o viac ako 20%

☒ strata schopnosti sa obslúžiť (neschopnosť napriek ad libitum prístupu k potrave a vode, tieto dosiahnuť).

☒ úsilné dýchanie, tvrdé brucho, so známkami sepsy, resp. peritonitídy

Počet a typ zvierat

Druh použitých zvierat je *mus musculus* (myš domová). Počet použitých zvierat na celú dobu riešenia je 570 samcov kmeňa C57BL/6 a 570 samíc kmeňa C57BL/6.

Preukázanie súladu s požiadavkou nahradenia, obmedzenia a zjemnenia

Nahradenie

Pretože v plánovaných experimentoch sa budú hodnotiť alterácie funkcie a štruktúry orgánov a následky terapeutických intervencií, je nevyhnutné, aby sa experiment vykonal „in vivo“ na celom zvierati. Využitie bunkových kultúr alebo počítačových simulácií neprichádzajú pri tomto type experimentu do úvahy ako alternatívny spôsob výskumného prístupu, navyše experimenty, ktoré by sa dali takto realizovať už realizované boli a nám uľahčili presnejší dizajn experimentu. V tomto štádiu ale pokusy musia byť realizované na myšiach.

Obmedzenie

V experimentoch bude použitý minimálny možný počet experimentálnych zvierat, ktorý je potrebný pre štatistické vyhodnotenie použitím dvojfaktorového ANOVA testu s posthoc analýzami a zachovaní dostatočnej štatistickej sily. Model vykazuje variabilitu, ktorá predpokladá, že u cca. 20% zvierat budeme musieť akceptovať príliš vysokú alebo nízku závažnosť kolitídy, čo sťaží analýzu. Experimenty nebudú vykonávané naraz, v prípade, že variabilita bude nižšia ako uvedených 20%, použijeme menej zvierat na skupinu. V experimente bude použitý minimálny počet kontrolných zvierat. Zvieratá budú objednávané v jednotnom časovom intervale, aby sa predišlo sezónnym zmenám a potrebe experiment opakovať. V experimentoch sa použijú geneticky homogénne rovnaké skupiny zvierat.

Zjemnenie

Zvieratá budú počas pokusov sledované priebežne, so záznamom každé 4h počas pracovnej doby. Po postupoch, t.j. odberoch krvi a aplikácie DNázy, budú zvieratá na vyhrievanej podložke až do momentu zobudenia a sledované kontinuálne. Bolesť a utrpenie budú hodnotené podľa Sotocinala et. al 2011, hodnotenie aspoň 1x do dňa zapisované. Zvieratá v evidentnom distrese dostanú analgetikum Meloxicam 0,5mg/kg s.c. V prípade, že zvieratá budú vykazovať zvyšujúci sa distress, bolesť a/alebo utrpenie podľa nami navolených human end-pointov a napriek analgetickej liečbe, bude zviera vyradené z experimentu. So zvieratami sa bude manipulovať jemne, budú mať prístup k vode aj potrave ad libitum, v klietkach sú dostupné hračky.

Spätné posúdenie

Vzhľadom na to, že ide o projekt, ktorý má predpokladanú ujmu strednú, projekt nebude podliehať spätnému posúdeniu.