

Príloha č. 2

## **Netechnického zhrnutia projektu**

**Názov projektu:** Krvné bunky ako zdroj bioaktívnych látok sprostredkujúcich neuroprotekciiu po globálnej a fokálnej ischemii mozgu.

### **Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:**

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** ischemia mozgu, kondicionovanie, ischemická tolerancia, krv, sekretóm

### **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:**

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

Ischemia mozgu predstavuje vážny spoločenský a medicínsky problém, ktorý je na popredných priečkach dôvodu úmrtnosti vekovo staršej populácie a výrazne ovplyvňuje kvalitu života preživších. Aj napriek intenzívnemu výskumu tejto problematiky neexistuje žiadna efektívna terapia vedúca ku zlepšeniu stavu postihnutého. Z dôvodu progresívneho zvyšovania percenta vekovo starších jedincov v rámci populácie sa experimentálny výskum stratégií eliminácie ischemického poškodenia nervového tkaniva stáva vysoko aktuálnym.

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

V prípade experimentálneho potvrdenia našej teórie na dvoch najčastejších modeloch mozgovej ischemie veríme, že rôznorodosť stimulov, ktorým budú krvné bunky ex vivo vystavené, nám pomôže identifikovať ten najefektívnejší z hľadiska neuroprotektívneho fenotypu. Zároveň budeme schopní porovnať mieru neuroprotektie s *in vivo* možnosťami kondicionovania. Rovnako predpokladáme, že sa nám podarí spoznať cestu, akou je tento signál prenášaný až na úroveň nervového tkaniva. Táto informácia predstavuje kľúčový bod pre ďalší klinicko-experimentálny výskum. Iba rozlúštenie presného mechanizmu prenosu a akcie faktora navodzujúceho toleranciu umožní aj identifikáciu možných rizík a následné priblíženie konceptu využitia stimulovaných krvných buniek do klinickej praxe. Výsledky predkladaného projektu by mohli mať nadväznosť na biomedicínsky výskum vo viacerých smeroch. Medzi najatraktívnejšie by mohli patriť: 1. Použitie kondicionovania ako priamej intervencie u pacientov postihnutých mozgovou príhodou; 2. Krvná transfúzia „tolerantnej“ krvi pacientovi, ktorému nie je možné aplikovať kondicionovanie, prípadne transfúziou zvýšiť či urýchliť efekt kondicionovania u postihnutého; 3. Využitie sekretómu stimulovaných krvných buniek za účelom aktivácie ischemickej tolerancie; 4. Autológne kondicionovanie v

rôznych formách (aj krvná transfúzia) ako nástroj prevencie u ľudí so zvýšeným rizikom výskytu mozgovej príhody; a mnohé iné.

### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samce v počte 736 ks a plody (E18) 800ks ako zdroj buniek pre *in vitro* analýzy izolované z maternice gravidnej samice potkana o počte 80 samíc na celú dobu riešenia.

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

Z hľadiska bolestivosti predpokladáme minimálny nepriaznivý vplyv na zvieratá. Operačné procedúry (ischémia mozgu, transfúzia, križová cirkulácia), ktoré budú vykonané skúsenými operátormi, nevyžadujú hrubý zásah do organizmu a dlhodobú rekonvalescenciu. Skupina zvierat bude absolvovať opakované odbery krvi cez permanentný katéter zavedený vo v. jugularis externa a napichnutím chvostovej žily. Tieto zákroky nepredstavujú hrubý zásah do organizmu a nevyžadujú dlhodobú rekonvalescenciu. Ďalšia skupina zvierat bude behaviorálne testovaná neinvazívnymi pamäťovými testami, ktoré nevyžadujú nasledovnú rekonvalescenciu zvierat'a. Z hľadiska prejavov operačných postupov na zvieratách je možné predpokladať krátkodobý vplyv na pamäťové a motorické funkcie.

### Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov (viď tabuľka 1) navrhujeme klasifikáciu krutosti postupu označiť ako „strednú“.

**TABUĽKA 1: Kvalifikácia krutosti všetkých manipulácií so zvieratami.**

| Postup                  |                                       | Klasifikácia krutosti  |         |
|-------------------------|---------------------------------------|--|---------|
| Operačný zákrok         | Fokálna ischémia                      | STREDNÁ  |         |
|                         | Globálna ischémia                     | STREDNÁ  |         |
|                         | Zavedenie permanentného katétra       | STREDNÁ  |         |
|                         | Kanulácia v. j. externa               | STREDNÁ  |         |
|                         | Preparácia maternice gravidnej samice | STREDNÁ  |         |
|                         | Transfúzia krvných buniek/sekretómu   | STREDNÁ  |         |
|                         | Križová cirkulácia dvoch zvierat      | STREDNÁ  |         |
| Pred- a pooperačná fáza | Navodenie tolerancie                  | 1) mechanické- subletálna ischémia mozgu                                 | STREDNÁ |
|                         |                                       | Pooperačné prežívania (0 až 3 dni)                                       | STREDNÁ |
|                         |                                       | Dlhodobé prežívania do 70 dní  | SLABÁ   |
|                         |                                       | Odber krvi cez permanentný katéter (do 14 dní)                           | STREDNÁ |
|                         |                                       | Odber krvi z chvosta   | SLABÁ   |
|                         |                                       | Prežívanie s katétrom (do 14 dní)  | STREDNÁ |
|                         |                                       | per os podanie glukózy   | SLABÁ   |
|                         |                                       | i.p. podanie (analgetikum, chlorahydrát, fyziologický roztok s glukózou) | SLABÁ   |
|                         | Navodenie tolerancie                  | 2) vzdialenej- ischémiou kostrového svalu                                | SLABÁ   |
|                         |                                       | 3) farmakologicky- i.p. dávkou bradykinínu                               | SLABÁ   |
|                         | Behaviorálne testovanie               | Bedersonov test  | SLABÁ   |
|                         |                                       | Morisovo vodné bludisko  | SLABÁ   |
|                         |                                       | Barensov test  | SLABÁ   |

## Uplatňovanie zásad 3R

### 1. Nahradenie zvierat:

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

Ischémia mozgu a postischemická regenerácia sú procesy dynamické, ťažko predvídateľné a závisiace na mnohých faktoroch. Ischemické poškodenie ovplyvňuje organizmus celosystémovo a naopak, ischémiou narušená homeostáza organizmu spätne vplýva na procesy neurodegenerácie v mozgu. Neexistuje žiaden model ischemického poškodenia nervového tkaniva, ktorý by bol schopný zohľadniť celkový fyziologický aspekt a ktorý by bol klinicky relevantnejší. Z týchto dôvodov nie je možné uskutočniť dané experimenty alternatívnym spôsobom bez použitia zvierat. Potkan laboratórny predstavuje evolučne najnižšiu formu geneticky, biologicky a behaviorálne človeku najbližšiu. Vzhľadom na svoju podobnosť sú vhodným a preferovaným animálnym modelom na navodenie symptómov ľudských patologických stavov s cieľom základného výskumu choroby a liečby.

### 2. Redukcia počtu zvierat:

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

Počet 736 ks samcov a 800ks plodov (E18) ako zdroj buniek pre *in vitro* analýzy izolované z maternice gravidnej samice potkana o počte 80 samíc, bolo stanovené vzhľadom k tomu, že (1) predpokladáme veľkú individuálnu variabilitu výsledkov, z tohto dôvodu plánovaný počet zvierat v skupine je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný pre získanie štatisticky významných výsledkov; (2) experimentálne skupiny uvedené v prílohe č. 1 sú potrebné na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia mozgu a krvných parametrov, určenie protektívneho vplyvu kondicionovania a definovanie biochemickej podstaty navodenia ischemickej tolerancie v organizme; (3) ischémiou poškodené nervové tkanivo nemôže byť použité zároveň na biochemické ako aj histologické a imunohistochemické analýzy; (4) Potreba veľkých objemov krvi pre biochemické, imunocytologické, genomické a proteomické štúdie, *in vitro* testovanie, rovnako ako aj *in vivo* testovanie stimulovaných krvných buniek a sekretómov, si vyžaduje štvornásobné navýšenie počtu zvierat v pozícii donorov krvných buniek; (5) počet zvierat v *in vivo* časti postupov bude zminimalizovaný aplikáciou *in vitro* skríningových analýz, t.j. *in vivo* budú aplikované len vzorky s potvrdeným neuroprotektívnym účinkom *in vitro*.

### 3. Zjemnenie:

V projekte budú použité samce potkana kmeňa Wistar, čo je štandardný model pre výskum tohto typu. Zvieratá pred zaradením do postupov budú v pravidelnom kontakte s operátorom z dôvodu redukcie stresu z manipulácie. Všetky zákroky, ktoré budú na zvieratách uskutočnené, budú vykonávané skúseným personálom pod celkovou anestéziou, t. j. nebudú pre zvieratá bolestivé. Zvieratám po operácii budú podané analgetiká, v prípade potreby aj počas doby prežívania. Utrpenie zvierat bude denne monitorované a jednotlivé parametre ohodnotené bodovým skóre. Pri dosiahnutí bodového skóre 3 v ktoromkoľvek zo sledovaných parametrov hlavných kritérií (viď obr. 1), bude zviera humane usmrtené letálnou dávkou

chloralhydrátu i.p., pri skóre nad 1 až 2 podanie analgetika prípadne roztoku glukózy. Zvieratá budú umiestnené v kletke po dvoch jedincoch tak, aby nedošlo k narušeniu ich prirodzeného správania. Prostredie vo vaniciach bude obohatené o hračky. Po ukončení pokusu budú jedince humánne usmrtené.

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie