

Príloha č. 2  
**Netechnické zhrnutie projektu**

**Názov projektu:** Terapeutické účinky kondiciovaného média kmeňových buniek na reparáciu poškodeného tkaniva miechy: porovnávacia ex vivo štúdia.

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 741/14-221

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** organotypické rezy, regenerácia, neurálne progenitory, mesenchymálne kmeňové bunky

**Účel projektu:** a) základného výskumu,  
b) translačného alebo aplikovaného výskumu s cieľom  
1. zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny,

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

Cieľom predkladaného projektu bude etablovanie ex vivo modelu traumatickejho poškodenia CNS tkaniva v podobe organotypických rezov miechy. V tomto modeli budeme sledovať účinky kondiciovaného média buniek (mezechýmových kmeňových buniek kostnej drene a tukového tkaniva, neurálnych progenitorov) na reparáciu mechanicky poškodeného tkaniva miechy potkana. Efektivitu kondiciovaných médií vyhodnotíme na základe prežívania a proliferáčného potenciálu gliovej populácie buniek, neurónov a prerastania nervových vláken.

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

Poškodenie miechy predstavuje neurodegeneratívne ochorenie CNS vedúce k poškodeniu a zániku neurónov, oligodendrocytov, astrocytov. V súčasnosti neexistuje žiadna účinná liečba pre poranenú miechu. Bunková terapia predstavuje kľúčovú oblasť regeneračnej medicíny s cieľom nájsť vhodné zdroje transplantovaných buniek alebo ich produktov umožňujúcich obnovu poškodeného tkaniva. Predpokladáme, že ex vivo model mechanického poškodenia bude vhodným postupom pri overovaní potenciálnych terapeutických stratégií traumy pred potvrdením účinnosti vo zvieracom modeli bez nutnosti použitia početných experimentálnych skupín zvierat.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

V experimentoch budú použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, v počte v 50ks dospelých +300ks P1-P21 mladých zvierat na celú dobu riešenia.

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

V tomto experimentálnom modeli zvieratám nebudú podávané žiadne chemické látky, nebudú vystavené škodlivému prostrediu, nepoužijú sa na nijaké invazívne alebo neinvazívne pokusné účely, využijú sa výlučne na účely použitia ich orgánov a tkanív. Všetky zásahy budú vykonané v celkovej izofluranovej anestézie (4%).

**Predpokladaná úroveň krutosti:** bez možnosti zotavenia

Postupy využívajúce sa v predkladanom projekte sa budú vykonávať v celkovej anestézii, po ktorej zviera nenadobudne vedomie, nakoľko zvieratá budú slúžiť ako zdroj tkanív a buniek.

**Uplatňovanie zásad 3R**

V databáze „European Centre for Validation of Alternative Methods „/ <http://altweb.jhsph.edu/>“ nebola nájdená žiadna alternatívna metóda. Cieľom práce je porovnať terapeutické účinky kondicionovaných médií buniek (neurálne progenitory, mesenchymálne bunky,) pri reparácii traumatickeho poškodenia nervového tkaniva v *in vitro* modeli, ktorý reprodukuje kľúčové aspekty poškodenia v *in vivo* systéme, pričom v konečnom výsledku by mohol poskytnúť priestor pre potencionálne liečebné postupy pred potvrdením účinnosti vo zvieracom modeli bez nutnosti použitia početných experimentálnych skupín zvierat. Zároveň dôjde aj k dodržaniu zásady znižovania počtu zvierat, keďže z jedného zvieraťa vieme súčasne izolovať viaceré typy buniek, potrebné pre ďalšie postupy pri tvorení *in vitro* modelu reparácie traumatickeho poškodenia nervového tkaniva. Osoby podielajúce sa na experimente budú so zvieratami manipulovať maximálne ohľaduplne, nebudú sa vykonávať postupy, ktoré spôsobujú zvieratám žiadne utrpenie, bolest alebo strach.

Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu: áno nie

## Príloha č. 2

### Netechnické zhrnutie projektu:

#### Názov projektu:

“Vyselektovanie probiotických kultúr s efektívnymi modulačnými vlastnosťami pri potlačení infekcie baktériou *Campylobacter jejuni*”

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: 863/14-221

#### Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):

kurča, inflamazóm, *Lactobacillus*, *Campylobacter jejuni*, mucín

#### 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 kolónii geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

#### Opísť ciele projektu:

V súčasnosti je venovaná zvýšená pozornosť nielen samotnej infekcii s *C. jejuni*, ale aj jej imunomodulácií po aplikácii probiotík. Záujem výskumu je orientovaný na pochopenie úlohy inflamazómu a následnej aktivácie produkcie cytokínov a chemokínov v patogenéze a iniciácii imunitnej odpovede.

V predkladanom projekte bude v *in vivo* postupoch u kurčiat testovaný preventívny účinok dvoch bakteriálnych probiotických kmeňov a síce v 1. postepe *Lactobacillus fermentum* – Biocenol™ LF99 (CCM 7514) a v 2. *Lactobacillus reuteri* B6/1 na infekciu *Campylobacter jejuni*. Overovanie prospešnosti bakteriálnych probiotických kmeňov v interakcii s kampylobakterom bude zamerané predovšetkým na zisťovanie, či v inflamazóme dochádza k aktivácii kaspázy 1, enzymu apoptózy, ktorý aktivuje prekurzory zápalových cytokínov IL-1 $\beta$  a IL-18, v súčinnosti so štúdiom ďalších imunologických, morfologických a mikrobiologických parametrov. Determinované zmeny budú zisťované v krvi, slezine, ceku, truse a svaloch, metódami polymerázovej reakcie (RT-PCR), prietokovej cytometrie, spektrofotometrie, histológie, imunohistochémie a bakteriológie.

U niektorých lactobacilov, vrátane *L. reuteri* a *L. fermentum* bola zistená inhibícia adhézie patogénov k mucínu agregáciou *in vitro*. Bakteriologickým vyšetrením v *in vivo* postepe bude možné potvrdiť alebo vylúčiť túto skutočnosť. Laktobacily produkujú aj biologicky aktívne zložky, ktoré môžu modulovať slizničnú imunitu hostiteľa, napríklad aktiváciou protizápalových mechanizmov. *L. reuteri* môže konvertovať dietetickú zložku L-histidín na imunoregulačný signálny histaním, ktorý supresuje produkciu prozápalového TNF.

V predošлом postupe pri testovaní bakteriálneho probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 *in vivo* u kurčiat, ktoré bolo vykonané po infekcii s *C. jejuni* bol preukázaný pozitívny vplyv na produkciu cytokínov imunokompetentnými bunkami izolovanými z krvi a céka kurčiat.

### **Prínos z vykonaného projektu**

Predpokladaný prínos bude spočívať v získaní a prehĺbení poznatkov mechanizmu pôsobenia testovaných laktobacilov štúdiom inflamazómu na infekciu *C. jejuni* v organizme kurčiat, vplyvu uvedených probiotických bakteriálnych kmeňov na imunitný stav kurčiat bez infekcie, aj po infekcii s *Campylobacter jejuni* a zistenia možnosti ovplyvnenia kolonizácie čreva kurčiat. V budúcnosti by tieto poznatky mohli byť využité na vývoj liečebného prípravku pri prevencii znižovania osidl'ovania čreva kampylobakterom jeho vytiesnením, alebo ovplyvnením skladby hlienovej vrstvy probiotickým kmeňom.

### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

Do dvoch postupov bude zaradených celkovo 240 kusov jednodňových brojlerových kurčiat hybridiu COBB 500, zmiešaného pohlavia, rozdelených do 4 skupín (n=30).

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

Počas sledovaného obdobia nebude bránené kurčatám v prirodzenom správaní, budú dodržané štandardy umiestnenia, chovu a starostlivosti, vyrušovanie bude obmedzené iba na aplikáciu probiotického a infekčného kmeňa baktérií, dôsledne bude monitorovaný zdravotný stav zvierat.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Na základe posudzovaných faktorov navrhujeme krutosť postupov označiť ako „strednú, bez možnosti zotavenia“.

### **Uplatňovanie zásad 3R**

#### **1. Nahradenie zvierat:**

Z dôvodu sledovania interakcií medzi *Campylobacter jejuni* (CCM 6191) a *Lactobacillus reuteri* B6/1 či *Lactobacillus fermentum* – Biocenol™ LF99 (CCM 7514) v organizme je použitie živých zvierat nevyhnutné. Jedným z dôvodov je detekcia kolonizujúcich baktérií a ich počtom v čreve a féces, prípadne aj v pečeni, druhým dôležitým dôvodom je možný výskyt morfologických zmien v čreve po aplikácii laktobacilov a kampylobakteru. Aplikácia probiotických laktobacilových kmeňov zároveň s kampylobakterovou koinfekciou môže viest' aj k zmenám parametrov v periférnej krvi a parenchymatóznych orgánov, preto je potrebné zaradiť testovanie na živých zvieratách.

#### **2. Redukcia počtu zvierat:**

Do postupu bude zaradených 240 ks kurčiat, bude vykonaných 5. odberov, pre každý odber a skupinu najmenší počet, na ktorom je možné robiť relevantné štatistické vyhodnotenie

pre publikovanie v karentových časopisoch. Pri väčších odberoch je použitie viacerých zvierat nevyhnutné, nakoľko budú vykonávané viaceré vyšetrovacie metódy a orgány u kurčiat vo veku do 2 týždňov, počas ktorých postup bude trvať. Pre zmysluplné vyhodnotenie výsledkov je uvedený počet zvierat nevyhnutný.

### 3. Zjemnenie:

Do postupu budú zaradené jednodňové kurčatá a infekcia bude vykonaná na 5. deň postupu z toho dôvodu, že so stúpajúcim vekom sa zvyšuje rezistencia kurčiat na kampylobakteriálnu infekciu. Niekoľko u kurčiat nespôsobuje zjavné klinické príznaky. V našom prípade pôjde o vysšiu dávku nízko invazívneho kmeňa, ktorý sa klinicky môže prejavíť iba slabou hnačkou, ale potenciálne s možnosťou indukcie zmien detegovaných genetickými, histologickými, imunologickými a bakteriologickými metódami.

V prípade výskytu príznakov budú choré zvieratá prednostne použité na odber biologických vzoriek. Zvieratá nebudú opäťovne zaradené do postupu, pretože všetky budú usmrtené a použité na odber vzoriek biologického materiálu.

Na zvieratách sa nebudú vykonávať zákroky, ktoré by boli bolestivé, alebo si vyžadovali anestéziu.

V priebehu postupu bude zvieratám venovaná štandardná veterinárna starostlivosť. Kontrola bude vykonávaná veterinárnym lekárom, zodpovedným za starostlivosť o zvieratá. Zvieratám nehrozí ani predávkovanie ani intoxikácia, jedná sa v podstate o štandardné postupy pre daný typ overovania pri zachovaní všetkých podmienok podľa prílohy č. 5 k nariadeniu vlády č.377/2012 Z.z.

Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu:                                nie

## **Netechnické zhrnutie projektu**

**Názov projektu:** Nácvik merania pravokomorovej katéterizácie a merania pravokomorového tlaku u potkanov v celkovej anestéze

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1059/14-221

**Účel projektu:** vysokoškolské vzdelávanie alebo odborné vzdelávanie na účely získania, udržania si alebo zlepšenia zručností potrebných na výkon povolania

## **Cieľ projektu**

Plánujeme doktorandov a odborných pracovníkov naučiť výkon pravokomorovej katéterizácie a meranie tlaku krvi v pravej komore srdca v celkovej anestéze.

## **Prínos z vykonaného projektu:**

Tieto zručnosti sú nutné pre dlhodobú samostatnú realizáciu postupov u doktorandov a odborných pracovníkov pri postupoch súvisiacich s experimentálnymi projektami s problematikou PAH riešených na našej katedre. Osvojenie si metodických zručností pred využitím postupov dlhodobo a kontinuálne zaručí, že experimentálne zvieratá budú využité odborne a získané výsledky budú valídne a využiteľné pre vedeckú komunitu a, ako dúfame, budú mať dopad aj na humánnu diagnostickú a terapeutickú prax.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :** Potkany, samce rodu Wistar, 90 jedincov

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

V postupoch sa plánuje intraperitoneálna aplikácia avertínu. Zvieratá môžu pri intraperitoneálnej aplikácii látok pocíťovať krátkodobú bolesť, ktorá však nebude významne narúšať pohodu, ani celkový stav zvierat. Ďalej meranie saturácie krvi kyslíkom pomocou pulznej oximetrie, ktoré nie je bolestivé a predstavuje minimálnu záťaž. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokej celkovej anestézie, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené.

## **Predpokladaná úroveň krutosti:**

slabé –pulzná oximetria, intraperitoneálna aplikácia avertínu

bez možnosti zotavenia – meranie EKG a katéterizácia pravej komory v anestéze, s následným utratením v CO<sub>2</sub>.

## **Uplatňovanie zásad 3R**

### **1. Nahradenie:**

Nakoľko ide o experimentálne postupy, v ktorých sa bude hodnotiť saturácia krvi kyslíkom, EKG, bazálna a beta adrenergicky stimulovaná funkciu pravej komory in situ, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat. Počítačové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako in vitro pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, najmä v rámci pravej komory ako celku.

### **2. Obmedzenie:**

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre osvojenie si metodických zručností. 15 zvierat na jedného experimentátora je minimálny počet, keďže sa jedná o precíznu a náročnú metodiku a je potrebné zaistiť, aby budúce experimenty zahŕňajúce meranie pravokomorového tlaku boli prevedené bezchybne, s valídnymi a reprodukovateľnými výsledkami.

### **3. Zjemnenie:**

Osvojovanie si postupov bude prebiehať pod dohľadom skúsených experimentátorov. Hemodynamické merania a EKG budú vykonávané v celkovej anestéze, zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým V prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí (napr. závažná porucha prístroja na meranie hemodynamiky) bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat. Hemodynamické merania a EKG budú vykonávané v celkovej anestéze, zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým.

**Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu:    áno    nie**

## **Netechnické zhrnutie projektu**

**Názov projektu:** Molekúlna a funkčná dynamika vzťahu medzi endotelínovým systémom a microRNA v monokrotalínom-navodenej pľúcnej hypertenzii u potkana

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1059/14-221a

**Účel projektu:** základný výskum

### **Cieľ projektu**

Cieľom projektu zistiť charakter a dynamiku zmien komponentov endotelínového systému a expresie mikroRNA v pľúcnej artérii, aorte, pravej a ľavej komore srdca, ako aj v plazme počas rozvoja pľúcnej hypertenzie navodenej monokrotalínom.

### **Prínos z vykonaného projektu:**

Pľúcna artériová hypertenzia je nevyliečiteľné ochorenie s nízkou kvalitou života a infauistnou prognózou s vysokou a skorou mortalitou. Bližšie poznanie patogenézy ochorenia môže pomôcť zlepšiť diagnostiku a hľadať nové terapeutické postupy, ktoré by mohli zlepšiť vyhliadky pacientov s týmto zriedkavým ochorením. MikroRNA by mohli byť markermi progresie ochorenia, ktoré býva identifikované v neskorých štadiách, a tiež terapeutickými cieľmi. Skorá diagnostika by mohla viesť k skorému nasadeniu liečby, čo by sa mohlo odraziť na zlepšení kvality života i prežívania pacientov.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty :** Potkany, samce rodu Wistar 284

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

Ide o experimenty, kde sa hodnotí vplyv dlhodobej liečby na fyziologické parametre ako elektrická a mechanická funkcia srdca, analýza molekulárnych zmien v kardiovaskulárnom systéme a plazme. Je potrebné vykonať experiment in vivo, teda na celom zvierati. V experimente sa plánuje subkutánna aplikácia liečiv. Zvieratá môžu pri subkutánnej aplikácii látok pocíťovať krátkodobú bolest, ktorá nebude významne narúšať pohodu, ani celkový stav zvierat. Samotné experimenty zamerané na zistenie funkcie srdca budú vykonávané v hlbokej celkovej anestéze, po ktorej zvieratá nenadobudnú vedomie a budú humánne utratené. Celkovo sa očakáva poškodenie pľúc a srdca po podaní monokrotalínu, dušnosť a zníženie fyzickej výkonnosti a telesnej hmotnosti. V prípade náhleho zhoršenia zdravotného stavu budú zvieratá humánne utratené.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

váženie zvierat – slabá

s.c. aplikácia monokrotalínu – slabá

meranie saturácie krvi kyslíkom pomocou pulznej oximetrie – slabá

i.p. aplikácia anestetika avertínu – slabá

hemodynamické merania v anestéze – bez možnosti zotavenia

dušnosť a zníženie fyzickej výkonnosti po dlhobdobom pôsobení monokrotalínu - stredná

### **Uplatňovanie zásad 3R**

#### **1. Nahradenie:**

Nakoľko ide o experimenty, v ktorých sa bude hodnotiť vplyv monokrotalínu (a plúcnej hypertenze) na histologické zmeny, molekulárno-biologické parametre, EKG, bazálnu a beta adrenergicky stimulovanú funkciu pravej komory *in situ*, nie je možné pokus vykonať bez použitia zvierat.

Počítacové simulácie nie sú v tomto prípade vhodným alternatívnym spôsobom, podobne ako *in vitro* pokusy, keďže na bunkových kultúrach nie je možné relevantne posúdiť funkciu kardiomyocytov, najmä v rámci pravej komory ako celku. Rovnako nemožno hodnotiť komplexné deje, akými je rozvoj plúcnej hypertenze, so sprievodnými etiopatologickými a kompenzačnými funkčnými a molekulárnymi zmenami vo viacerých orgánoch súčasne.

## 2. Obmedzenie:

V experimentoch bude použitý minimálny počet experimentálnych zvierat potrebný pre štatistické vyhodnotenie a zachovanie relevantnosti pokusu. Počet v skupinách, ktorým je podávaný monokrotalín a zvieratá sú ponechané dlhšie, než jeden týždeň, je určený na základe predchádzajúcich výsledkov, ako aj iných autorov, ktorí poukázali na 40-50% úmrtnosť po podávaní monokrotalínu, ako aj prípadnú perioperačnú mortalitu, spojenú s invázivným zákrokom pri meraní pravokomorovej funkcie. Zvieratá, ktoré budú použité na meranie pravokomorovej funkcie nie je možné použiť na molekulárne analýzy a histológiju, vzhľadom na pôsobenie anestézy a dobutamínu, ktorý môže dramaticky ovplyvniť génovú expresiu. Preto je nutné mať rovnako ovplyvnené skupiny zvierat v prvej i druhej fáze. Kontrolné skupiny sme zredukovali, keďže nepredpokladáme zmeny v molekulárnych parametroch počas 12h, 1, 2 a 4 dní pôsobenia placebo (vehikula monokrotalínu), a ponechali sme len jednu kontrolnú skupinu k 12h, 1,2,4 dňom pôsobenia monokrotalínu a separátne kontroly len k 1, 2, 4 týždňom pôsobenia monokrotalínu.

## 3. Zjemnenie:

Výsledky jednotlivých častí štúdie budú priebežne vyhodnocované a v prípade zistenia nevhodných neočakávaných udalostí bude experiment ukončený a následne predložený nový projekt tak, aby sa znížil počet používaných zvierat. Hemodynamické merania a EKG budú vykonávané v celkovej anestéze, zvieratá budú humánne utratené oxidom uhličitým. Keďže cieľom nie je štúdium mortality, ale sa najmä v poslednom týždni očakáva dušnosť, zníženie fyzickej výkonnosti, môžu byť zvieratá humánne utratené ešte pred skončením pokusu, ak budú vykazovať akútne zhoršenie stavu – naježená srst, apatia, miznutie sociálnych foriem správania, neschopnosť prijímať potravu, náhly úbytok hmotnosti o 15%-20% počas niekoľkých dní (zvieratá budú vážené každý deň).

Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu: áno do 1.8.2022 ťažiar

zohľadni výsledky projektu  
na späťnej prehliadke

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

**Názov projektu:** 1065/14-221

**Imunizácia králikov látkami BIOVENDOR**

**a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.**

**Cieľom** projektu je získavanie hyperimúnneho séra po imunizácii králikov pre aplikovaný výskum pri vývoji a výrobe diagnostík, z ktorých sa budú purifikovať protilátky. Získané protilátky sa použijú pri vývoji a výrobe komerčných ELISA kitov pre humánnu medicínu. Tieto sú plánované využívať pri detekcii proteínov, ktoré sú súčasťou metabolických procesov v ľudskom tele, ako aj procesov tvorby nádorov.

Očakávaným **prínosom** projektu bude rýchla a pomerne jednoduchá diagnostika závažných ochorení a patologických stavov v humánej medicíne. Na získanie krvných sér s plánovaným využitím pri výrobe diagnostík pre zisťovanie ochorení človeka **prínos** projektu výrazne prevyšuje **ujmu** u experimentálnych králikov.

Predpokladaná **ujma** na použitých zvieratách bude len v diskomforte pri fixácii králikov počas aplikácie antigénov i odberov krví počas postupov. Samotný úkon však bude krátkodobý nespôsobujúci dlhodobú bolest, utrpenie alebo stres a bez potreby podania celkovej anestézie i analgetík. V prípade výskytu bolestivých stavov sa použije analgetikum Novasul.

V jednotlivých častiach projektu sa použije celkom 300 dospelých králikov, samcov i samíc (kmeň Hyl - Novozélandský biely x Kalifornský králik) vo veku 4-6 mesiacov. Imunizácia králikov sa vykoná injekčným podaním antigénu v adjuvanse subkutánnou aplikáciou do lopatkovej oblasti na chrbte. Zvieratá budú fixované vo fixačných klietkach v krátkom časovom úseku, aby sa nevyvolával zbytočný stres a bolest. Za účelom získavania krvného séra sa uskutočnia odbery krvi z ušnej artérie. Králiky sa budú fixovať vo fixačných klietkach a zákrok sa vykoná v čo najkratšom čase.

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

**Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)**

V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda produkcie krvného séra pre výrobu medicínskych produktov. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zisťovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre získavanie krvi nie je možné v projekte nahradíť navrhnutý animálny model alternatívnymi metódami. Králik domáci je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre získavanie dostatočného množstva krvného séra.

**Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)**

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych králikov tak, aby neboli ohrozený cieľ projektu a bolo zabezpečené dostatočné množstvo krvného séra potrebného pri výrobe diagnostík. Použijú sa samci aj samice, aby sa nemuseli zvieratá z chovu vyrádovať pre medziophľavné rozdiely. V rámci štrenia sa nebudú zaraďovať nové jedince do skupín jednotlivých antigénov, ak zdravotný i kondičný stav umožní použiť overeného králíka.

Nakoľko pri použití opakovanej dávky jednotlivých antigénov pre zvieratá v danej skupine sa jedná o dlhodobý projekt, v ktorom dobrý zdravotný stav a dobrá kondícia zvierat hrajú veľmi dôležitú úlohu, starostlivosti o zvieratá ako i manipuláciu s nimi sa bude venovať veľká pozornosť. Zvieratá budú ošetrované skúsenými pracovníkmi a budú pod neustálym dohľadom veterinárneho lekára. Králiky budú mať k dispozícii dostupné prostriedky zlepšujúce ich životné podmienky v projekte. Postupy používané pri aplikáciách i odberoch krvi majú nízku úroveň z hľadiska spôsobenej bolesti a stresu a budú taktiež vykonávané skúseným pracovníkom s dlhorocnou praxou. Pri výskyte bolestivých stavov sa postihnutému jedincovi podá prostriedok na zníženie bolesti (Novasul). Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokej celkovej anestézii.

**Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu:**      **nie**

## **Netechnické zhrnutie projektu**

**Názov projektu:** *Mechanizmy zahrnuté v endotelovej dysfunkcii indukowanej kyselinou močovou v závislosti od veku a genetickej predispozície k hypertenzii*

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1087/17-221

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** endotel, hypertenzia, kyselina močová, SHR, WKY

**Účel projektu:** Základný výskum

**Ciele projektu:**

Štúdie poukázali na významný vzťah medzi zvýšenou koncentráciou kyseliny močovej (KM) v krvi (hyperurikémiou) a kardiovaskulárnymi ochoreniami (KVO), vrátane hypertenzie. Stále je však nedostatok informácií o mechanizmoch, ktorými kyselina močová môže viesť k poškodeniu cielových orgánov. Hyperurikémia (HU) pridružená k hypertenzii je spojená s endotelovou dysfunkciou. Mechanizmy, ktorými hyperurikémia vyvoláva endotelovú dysfunkciu však objasnené nie sú. Cieľovou štruktúrou projektu je preto endotel kardiovaskulárneho systému a jeho produkty s relaxačným a konstrikčným účinkom. Tento projekt sa zameriava na objasnenie vzťahov hyperurikémie a artériovej hypertenzie, najmä z pohľadu endotelovej funkcie. Cieľom je priniest nové výsledky objasňujúce dopad zvýšenej koncentrácie kyseliny močovej na endotel a odhaliť tak mechanizmy, ktoré sa môžu uplatňovať pri endotelovej dysfunkcii v konduktívnych a malých rezistentných artériach izolovaných z peri-pubertálnych a dospelých normotenzných, prehypertenzných a hypertenzných potkanov. Výsledky prispejú k poznaniu patofyziologických mechanizmov hyperurikémiou-indukowanej endotelovej dysfunkcie.

Cieľom predkladaného projektu je komplexné sledovanie kyselinou močovou-indukovaných zmien vo funkcii endotelu rôznych ciev izolovaných zo samcov potkanov – normotenzných, hranične hypertenzných (tj. prehypertenzných) a potkanov začažených hypertensiou. Projekt umožní zhodnotiť špecifické zmeny vo funkcii endotelu v dôsledku zvýšenej koncentrácie kyseliny močovej u normotenzných, prehypertenzných a hypertenzných zvierat rôznych vekových kategórií a mal by odhaliť doteraz málo známe mechanizmy v endotelom sprostredkovanej regulácii kardiovaskulárneho systému počas hyperurikémie. Bunkové mechanizmy, podielajúce sa na vývoji endotelovej dysfunkcie počas hypertenzie a hyperurikémie, doteraz nie sú celkom známe a dostupné literárne údaje sú kontroverzné. Pri pokusoch ozrejmíť úlohu endotelu v týchto stavoch boli pozorované rozmanité výsledky. Uvedené skutočnosti determinujú aj naše ciele čo najkomplexnejšie zhodnotiť kyselinou močovou podmienené zmeny funkcie endotelu, a to v závislosti od veku a tlaku krvi.

## **Prínos z vykonaného projektu:**

Doteraz nie je jednoznačne identifikovaná pozícia KM ako protektívneho (vzhľadom na jej antioxidačné vlastnosti) alebo rizikového faktora, resp. ako inertného markera pri rôznych chorobných stavoch a to najmä z pohľadu endotelovej funkcie. Odpoveď na túto otázku je však nesmierne dôležitá, nakoľko endotelová dysfunkcia je prvým krokom vo vývoji aterosklerózy. Taktiež pre nedostatok dôkazov v súčasnosti neexistujú odporúčania či liečiť alebo neliečiť asymptomatickú hyperurikémie pridruženú k hypertenzii alebo prehypertenzii. Očakáva sa, že klinicko-experimentálny výskum hyperurikémie v blízkej budúcnosti zmení pohľad na potrebu farmakologickej liečby najmä asymptomatickej hyperurikémie.

K vysvetleniu niektorých nejasností v patomechanizmoch KM-indukovanej endotelovej dysfunkcie, resp. KM-indukovaného zhoršenia endotelovej dysfunkcie pri hypertenzii môže prispieť aj experimentálny výskum na zvieracích modeloch. Tento projekt prinesie nové poznatky o úlohe KM v (pato)mechanizmoch uplatňujúcich sa v modifikácii funkcie endotelu. Vzhľadom na predpoklad, že zvýšená koncentrácia KM spôsobuje endotelovú dysfunkciu najmä v prítomnosti ďalších rizikových faktorov (napr. pri hypertenzii), ale aj vzhľadom na jej antioxidačné vlastnosti, zámerom navrhnutého projektu je zistiť či akútne vystavenie izolovaných ciev zvýšenej koncentrácie KM vedie k zlepšeniu endotelovej funkcie alebo k endotelovej dysfunkcii resp. jej zhoršeniu, a následne odhaliť mechanizmy KM-indukovanej endotelovej dysfunkcie na izolovaných konduktívnych ako aj rezistentných artériach získaných z experimentálneho modelu esenciálnej hypertenzie a prehypertenzie a ich normotenzných kontrol. Výsledky projektu môžu prispieť k informáciám o mechanizmoch, ktorými KM môže sprostredkovať poškodenie cielových orgánov, pričom tieto znalosti môžu byť rozhodujúce pre ďalší osud pacientov. Štúdium funkčných zmien endotelu a identifikácia faktorov, ktoré vedú k dysfunkcii endotelu, prinesú nové informácie o patogenéze aterosklerózy a možnostiach ovplyvnenia endotelu, čo výrazne prispeje ako primárnej tak aj sekundárnej prevencii KVO a tým aj zníženiu nákladov na liečbu ochorení súvisiacich s HU.

Originalita predkladaného projektu je založená na komplexnom zhodnotení funkčných, molekulárnych a biochemických zmien endotelu v prítomnosti zvýšenej koncentrácie kyseliny močovej a to v prítomnosti alebo neprítomnosti hypertenze resp. prehypertenze. Na základe známej heterogenity vlastností endotelu, ktoré sú závislé od veľkosti a typu ciev, v našom projekte zhodnotíme rôzne typy ciev, čo nám umožní integrovaný pohľad na kyselinou močovou podmienené zmeny v cievnom systéme. Takáto komplexná štúdia, hodnotiaca rôzne typy ciev z vysokotlakového a nízkotlakového systému, doteraz nebola uskutočnená. Získané poznatky by mali podporiť hypotézu, že endotel je cielovou štruktúrou pre novú strategiu ochrany kardiovaskulárneho systému aj počas asymptomatickej hyperurikémie a nezávisle od prítomnosti hypertenze a prispieť novými poznatkami o mechanizmoch poškodenia vaskulatúry počas hyperurikémie. Výsledky pokusov, najmä odhalenie možných mechanizmov prispievajúcich k vzniku endotelovej dysfunkcie, môžu byť dôležité pre ďalší rozvoj nových liečiv za účelom ochrany endotelu a zabránenia poškodeniu ciev, najmä aterosklerózou.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:** Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*), plemeno Wistar-Kyoto (WKY) potkan: 42 kusov, hranične hypertenzný potkan (BHR): 42 kusov a spontánne hypertenzný potkan (SHR): 42 kusov, samce. Predpokladaný celkový počet potkanov je 126 kusov.

**Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:** Počas neinvazívneho merania hemodynamických parametrov sa s potkanmi zaobchádza šetrne, avšak môže dochádzať k miernej nepohode a strachu. Počas celého trvania projektu nepredpokladáme nepriaznivý vplyv na zvieratá.

#### **Predpokladaná úroveň krutosti: slabá**

rutinná starostlivosť a váženie - slabá krutosť (krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou, žiadna bolesť, trvanie 1-5 minút)

meranie hemodynamických parametrov neinvazívne na chvoste - slabá krutosť (krátkodobý mierny stres spôsobený manipuláciou a miernym obmedzením pohybu, žiadna bolesť, trvanie 5-8 minút)

usmrcovanie zvierat na konci postupu, po uvedení do bezvedomia sa vykoná dekapitácia - Zvieratá budú znecitlivené celkovou anestéziou do hlbokého bezvedomia účinkom oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) - slabá krutosť. Pri znecitlivení budú zvieratá umiestnené do špeciálne konštruovaných komôr až po dosiahnutí najvyššej možnej koncentrácie oxidu uhličitého v komore privádzaného zo zdroja 100%-ého CO<sub>2</sub> tak, aby sa vylúčilo poranenie zvierat a bolo možné ich vidieť. CO<sub>2</sub> sa aplikuje skúseným pracovníkom s dlhorocňou praxou. Zvieratá budú humánne usmrtené tak, že najprv budú vystavené parám CO<sub>2</sub>, až do straty vedomia, aby sa minimalizovala bolesť, utrpenie, úzkosť a strach, následne sa usmrtenie uskutoční dekapitáciou v celkovej hlbokej anestézii – kategória krutosti: slabá

### **Uplatňovanie zásad 3R**

#### *1. Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)*

Funkčná, ako aj biochemická heterogenita vlastností endotelu (závislá od typu a veľkosti ciev v organizme) bohužiaľ neumožňuje v našom projekte nahradíť animálny model alternatívnymi metódami, ktoré by nahradili podmienky v *in vivo* modeloch. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nie je možné použiť počítačový model zvieratá a najvhodnejším modelom je laboratórny potkan. Vedeckým odôvodnením použitia potkanov na experiment je, že sú to živé organizmy poskytujúce dynamický systém a vďaka svojej podobnosti v základnej stavbe aj funkcií srdcovo-cievnej sústavy s človekom, sú vhodné na objasnenie príčin fyziologických a patofyziologických problémov humánnej medicíny. Sponfánne hypertenzný potkan (SHR) je najvhodnejším a najčastejšie používaným laboratórnym modelom pre výskum ľudskej esenciálnej hypertenzie (EH). Patogenéza hypertenzie u SHR sa v mnohých aspektoch podobá EH u ľudí a preto je vhodným modelom pre jej funkčné a biochemické štúdie. Ako model prehypertenzie použijeme model potkanov s hranične zvýšenými hodnotami tlaku krvi tzv. hranične hypertenzné potkany (BHR), ktoré sú z hľadiska experimentálnej práce mimoriadne výhodné, vzhľadom na skutočnosť, že hypertenzia ešte nie je u BHR plne rozvinutá. V projekte sme ako normotenznú kontrolu zvolili kmeň Wistar-Kyoto potkanov podľa literárnych údajov.

V overených medzinárodných registroch alternatívnych metód (Alternatives to Animal Testing: ECVAM: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>, PubMed: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, ALTBIB: <https://toxnet.nlm.nih.gov/altbib.html>,

JRC: <https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/search>, IAAPEA: <http://www.iaapea.com/alternative.php>, USDA: <https://www.nal.usda.gov/>) sme hľadali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. Pre sledovanie nami vytýčených cieľov nemáme inú možnosť ako použiť laboratórnych potkanov.

### *2. Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)*

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych zvierat tak, aby neboli ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukovanosť a validita pokusu pre fyziologické, a biochemické analýzy, ich štatistické vyhodnotenie a aby boli závery všeobecne prijateľné. Projekt je zostavený tak, aby sme dosiahli čo najväčší počet výsledkov pre štatistickú analýzu pri čo najmenšom počte experimentálnych zvierat. V experimentoch je zabezpečený optimálny počet experimentálnych zvierat na základe analýzy štatistickej sily ako aj na základe našich predchádzajúcich experimentov.

Po humánnom usmrtení zvierat sa okrem ciev odoberie maximálne množstvo vzoriek (krv, ďalšie tkanivá a orgány) na sledovanie funkčných, biochemických ako aj molekulárno-biologických parametrov.

### *3. Zásada zjemnenia (refinement)*

Zvieratá budú chované v modernom, schválenom pokusnom zariadení s chovom zvierat pre vlastnú potrebu s maximálnym komfortom. Zvieratá budú pod stálou kontrolou zmluvného veterinárneho lekára. Osoby, ktoré budú manipulovať so zvieratami, majú viacročné skúsenosti. Zvieratá budú umiestnené v stálych sociálnych skupinách až do konca postupu. Potkany v priebehu postupu prežívajú mierny stres, ktorý budeme minimalizovať šetrným zaobchádzaním a obohatením prostredia predmetmi na hru a ohryzovanie. Zvieratá v danom projekte nebudú vystavené utrpeniu. Usmrtenie bude prebiehať bezbolestne v hlbokej celkovej anestézii. Zvieratá sa najskôr vystavia účinku oxidu uhličitého v uzavretej nádobe až do straty vedomia. V hlbokom bezvedomí budú následne dekapitované, odoberie sa im krv a po otvorení hrudnej a brušnej dutiny budú odobraté príslušné cievy a ďalšie tkanivá a orgány.

**Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu:**       nie

# NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 660/14 -221a

**Názov projektu:** Overenie antiparazitického, hepatoprotektívneho a antifibrotického účinku čistých prírodných látok: silybin, dehydrosilybin a silychristín samotných a v kombinácii s antihelmintikom albendazol na modelovom ochorení vyvolanom larvami pásomnice *Mesocestoides vogae*.

## Účel projektu:

b/translačný alebo aplikovaný výskum s cieľom

1. zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka, zvierat alebo rastlín alebo ich účinkov na ľudí, zvieratá alebo rastliny,

**Ciele projektu:** Overiť účinky silymarínových flavonolignanov: silybin, dehydrosilybin a silychristín samotných a v kombinácii s albendazolom na modelové parazitické ochorenie vyvolané inokuláciou lariev pásomnice *Mesocestoides vogae*. Projekt má za cieľ komplexne vyhodnotiť vplyv týchto látok samotných a v kombinácii s antilmintikom albendazol.

**Prínosy:** V súlade so súčasným trendom vo farmakologickom výskume pri chronických ochoreniam s komplexnou patológiou a supresiou imunitného sa overí aj synergistický účinok kombinovanej liečby. Prínosom bude originálne zistenie účinkov liečby na redukciu počtu lariev v pečeni a peritoneálnej dutine, ochranného účinku na bunky pečene pred oxidačným stresom, ktorý významne prispieva k fibrogenéze pečene počas infekcie parazitmi. Prínosom budú informácie o účinku na imunitné bunky v pečeni počas infekcie, ktoré sa tiež významou mierou podieľajú na patogenéze a chronicite ochorenia. Larválne štádia helmintov, vrátane pásomníc, si v priebehu evolúcie vyvinuli mechanizmy umožňujúce dlhodobé prežitie v hostiteľskom organizme v dôsledku potlačenia akútneho zápalu a ďalších mechanizmov vedúcich k zlyhaniu fyziologických funkcií organizmu. Uvedený modelový druh pásomnice má schopnosť nepohlavného rozmnožovania, podobne ako medicínsky významné druhy pásomníc, pri ktorých je súčasná monoterapia zdlhavá, často nedostatočná a spôsobuje nepriaznivé vedľajšie účinky. Albendazol je antihelmintikum, ktoré špecificky pôsobí na cytoskeletom buniek parazitov ale pôsobí negatívne aj na bunky hostiteľa a larvami vyvolaná imunosupresia imunitného systému sa tiež podielá na obmedzenej účinnosti liečby. Silymarín je látka izolovaná z rastliny *Silibum mariannum* a predstavuje zmes flavonolignanov: silybin, silychristín a dehydrosilybin, ktoré budú v pokuse aplikované ako čisté látky. Bolo dokázané, že tieto silymarínové flavonolignany majú významný imunomodulačný, protirakovinový a antioxidačný účinok tým, že ovplyvňujú mnohé receptory, transkripčné faktory a signálnej dráhy v rôznych bunkách cicavcov aj v podmienkach *in vivo* u myší, pričom účinky na larvy počas infekcie nie sú známe. Výsledky z predkladaného experimentu ukážu výhody aplikácie *in vivo* a vysvetlia sa súčasne aj kľúčové imunologické a patologické mechanizmy pôsobenia oboch látok na hostiteľa. Tie budú predstavovať informácie pre ďalšie predklinické testovanie u ľudí.

**Ujmy:** Kedže larvicídny účinok uvedených látok počas infekcie neboli overené a nie je známa ich farmakokinetika u infikovaných myší, nedá sa predpokladať, že všetky látky preukážu signifikantný antiparazitický účinok. Na druhej strane ich pozitívny účinok na bunky hostiteľa je vysoko pravdepodobný.

**Celkový počet a typ zvierat:** 70 ks, myši inbrédneho kmeňa BALB/c, pohlavie samice.

**Dodržiavanie zásad 3 R**

Zásada nahraditeľnosti zvierat: Laboratórne myši kmeňa BALB/c sú vnímanými kmeňom voči infekcii larválnym štádiom pásomnice *Mesocestoides vogae*, u ktorých larvy infikujú pečeň a peritoneálnu dutinu. Živočíšne modely vnímané voči infekciám helmintami umožňujú študovať komplexné hostiteľsko-parazitické interakcie a ich ovplyvnenie liečivami a inými látkami, čo nie je možné nahradíť metódami *in vitro*. Myš zároveň predstavuje najnižší cicavčí model, na ktorom je možné experimenty vykonať.

Zásada zjemnenia pokusu použitím anestézie a analgetík: Zásada „zjemnenia“ bude dodržiavaná v plnej mieri. Zvieratá budú v prvej etape získané z chovného zariadenia a bude im umožnená fáza adaptácie na prostredia zvieratníka. V druhej etape budú zaradené zvieratá z vlastného chovu, a preto sú zvyknuté na prítomnosť človeka spojenú s bežnými dennými procedúrami a manipuláciou (čistenie, kŕmenie, napájanie, kontrola zdravotného stavu). Zvieratá budú chované v štandardných podmienkach, nevyvolávajúcich stres a budú im poskytnuté vhodné hračky. Orálne podanie látok resp. infekcia živými larvami bude vykonaná skúsenou technickou pracovníčkou, bez podania anestézie, pretože zvieratá pri tomto procese nebudú vystavené dlhodobým bolestivým podnetom. Po aplikácii látok a infekcií sa nepredpokladá zhoršenie zdravotného stavu zvierat a nie je potrebné používať analgetiká.

Zásada znižovania počtu zvierat: Naplánovaný počet na jednotlivé odberové dni je výsledkom čo najväčšej minimalizácie, pričom sa berie do úvahy potreba dostačného množstva vzoriek na naplánovanú rozsiahlu skupinu analýz a testov. Bolo potrebne brať do úvahy aj štatistické vyhodnotenia výsledkov s potrebným množstvom dát s cieľom zamedziť opäťovnému opakovaniu celého pokusu.

### Klasifikácia krutosti postupov:

#### 1. Slabá:

*f) subkutánne, intramuskulárne, intraperitoneálne podávanie látok, podávanie látok cez sondu a intravenózne podávanie látok cez povrchové krvné cievky, ak látka má len slabý vplyv na zvierat a jej objemy sú v rámci limitov primeraných pre veľkosť a druh zvierat a.*

Zvieratá budú sondou infikované malým počtom larev a počas trvania experimentov sa vyvinie len menej intenzívna infekcia, ktorá nespôsobí zvieratám vážne zdravotné problémy. Podávanie antihelmintika a silymarínových flavonolignanov sa uskutoční orálne sondou pri vedomí a nespôsobí zvieratám bolesť, resp. len slabú a krátkodobú. Počas experimentu nedôjde k žiadnym obmedzeniam štandardov na umiestnenie, chov a starostlivosť.

Vyžaduje/nevyžaduje sa spätné posúdenie projektu.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 660/14 -221

**Názov projektu:**

Kontinuálne pasážovanie larválnych štadií *Echinococcus multilocularis* a *Echinococcus granulosus* na laboratórnych zvieratách pieskomil mongolský (*Meriones unguiculatus*).

**Účel projektu:**

Základný výskum a aplikovaný výskum s cieľom diagnostiky a liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka a zvierat.

**Ciele projektu:** Cieľom projektu je kultivácia izolátov *Echinococcus* spp. získaných od humánnych pacientov za účelom potvrdenia diagnózy v nejasných a sporných prípadoch (biologický pokus) a ich následné udržiavanie s cieľom získania dostatočného množstva larválnych štadií na prípravu špecifických antigénov potrebných na diagnostiku ochorenia u ľudí sérologickými metódami.

Nakoľko množstvo vzoriek získaných od pacientov pri chirurgickom zákroku alebo biopsii je často veľmi malé, kultivácia na pieskomiloch navyše umožní získanie dostatočného množstva materiálu z jednotlivých izolátov na ich ďalšie analýzy, genotypizáciu kmeňov cirkulujúcich na území Slovenska a ich porovnanie s genotypmi vyskytujúcimi sa v iných častiach sveta.

**Prínosy:** Echinokokóza je závažné ochorenie ľudí, ktorej včasná a správna diagnostika výrazne zlepšuje prognózu a možnosti terapie pacienta. Pasážovanie a kultivácia infekčných štadií pásomníc rodu *Echinococcus* umožní získanie dostatočného množstva materiálu na prípravu špecifických antigénov na diagnostiku ochorenia. Izoláty budú zároveň v rámci základného výskumu použité na ich charakterizáciu a genotypizáciu kmeňov cirkulujúcich na území Slovenska.

**Ujmy:** Počas projektu bude použitý humánný spôsob manipulácie so zvieratami. Infekcia sa bude vykonávať pri plnom vedomí zvierat, bez anestézie formou intraperitoneálnej aplikácie, ktorá je veľmi krátka a nespôsobuje zvieratám vážny stres a nepohodu, preto im nebude spôsobená žiadna väžna ujma. Navyše, znecitlivenie pri infikovaní by pre zviera predstavovalo väčší stres ako samotný zákrok a môže mať nežiaduce vedľajšie účinky. Po ukončení kultivácie budú zvieratá humánné usmrtené cervikálnou dislokáciou, nakoľko odber larválnych štadií pásomníc z dutiny brušnej si vyžaduje usmrtenie zvierat.

**Celkový počet a typ zvierat:** Pieskomil mongolský (maximálne 20 ks/rok)

**Dodržiavanie zásad 3 R**

**Zásada nahraditeľnosti zvierat:** Zvieratá budú použité na *in vivo* kultiváciu vývinových štadií parazita v minimálnom počte. Tento vývoj vyžaduje hostiteľa. Zvolený druh pieskomil mongolský (*Meriones unguiculatus*), je vnímaný na infekciu, pričom ochorenie pomerne dlho prebieha bez väčších klinických príznakov. Hlavným príznakom dostatočného vyvinutia larválnych štadií pásomníc je zväčšenie dutiny brušnej, ktoré je ľahko rozpoznameľné, čo umožňuje ukončenie pasážovania aby zvieratá netrpeli.

**Zásada zjemnenia pokusu použitím anestézie a analgetík:** Počas kontinuálneho pasážovania kmeňa parazita sa so zvieratami manipuluje len jednorazovo, a to počas nakazenia, ktoré sa vykonáva intraperitoneálnou aplikáciou infekčného materiálu. Jedná sa o krátky a pomerne bezbolestný zákrok, ktorý si nevyžaduje anestéziu, ktorá by pre zviera mohla predstavovať väčší stres, ako injekcia samotná. V nasledujúcich týždňoch, počas ktorých sa u zvierat vyvijajú infekčné štadia parazita, sa so zvieratami manipuluje výlučne v rámci každodennej opatery

a starostlivosti a nie sú vystavené bolesti, ani utrpeniu, nie je preto potrebné podávanie utišujúcich prostriedkov. Denne sa sleduje ich zdravotný stav a v prípade prítomnosti klinických príznakov ochorenia sú humánne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

**Zásada znižovania počtu zvierat:** Počet zvierat žiadanych pre pasážovanie parazita je zvolený ako minimálny možný, vzhľadom na to, že súčasne plánujeme použiť na infekciu maximálne 20 jedincov ročne. Tento počet je nevyhnutný z dôvodu zabezpečenia dostatočného množstva parazitárneho materiálu na prípravu antigénov pre diagnostiku ochorenia, ktorá sa vykonáva na našom ústave. Menší počet zvierat by mohol znamenáť, že v prípade, ak by bolo nutné niekoľko zvierat utratíť pre zhoršenie zdravotného stavu, alebo v prípade ich úhynu skôr, ako dôjde v vývinu do fertilného štadia, by sme stratili kmeň, čo by viedlo k problémom s opäťovným získaním takéhoto materiálu.

**Klasifikácia krutosti postupov:** slabá krutosť

**Vyžaduje/nevyžaduje sa spätné posúdenie projektu.**

Projekt nie je potrebné spätné posúdiť, nakoľko sa pri jeho realizácii využívajú iba postupy s krutosťou klasifikovanou ako slabá krutosť a nie sú pri nich využívané primáty.

NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU: 660/14-221c

**Názov projektu:** Štúdium farmakokinetiky nového typu adjuvansu.

**Ciele projektu pokusu a predpokladaná ujma a prínosy:** Projekt bude zameraný na overenie účinnosti antirabickej vakcíny s využitím nového typu adjuvansu proti besnote a ďalším lyssavírusových infekciách, ako aj možnosti jej ovplyvnenia.

**Prínosy:** Vakcinácia je jedným z najdôležitejších preventívnych opatrení, vykonávaných pre zabezpečenie ochrany – imunity proti infekčným chorobám. Overenie účinnosti antirabickej vakcíny s využitím nového typu adjuvansu je nevyhnutné vykonať v laboratórnych podmienkach na laboratórnych zvieratách, ktoré sú jediným modelom umožňujúcim sledovať detailný vývoj imunitnej odpovede na vpravený protekčný antigén, ktorý je potencovaný novým typom adjuvansu. Laboratórne myši sú najvhodnejším modelom na získanie relevantných štatisticky vyhodnotiteľných výsledkov.

**Ujmy:**

1. časť projektu – Stanovenie protektívnej aktivity antirabických vakcín (metóda NIH na myšiach)

Zvieratá budú imunizované intraperitoneálne jednorazovou aplikáciou, čo je zákrok nebolestivý a nevyžaduje si použitie analgetík. Zvieratá na 14. deň po vakcinácii budú intracerebrálne čelenžované lyssavírusovým kmeňom, resp. kmeňom CVS; pri čelenži bude použitá krátkodobá sedácia s použitím ketamínu v dávke 80-100mg/kg intraperitoneálne. Aplikáciu vykoná veterinárny lekár zariadenia. Po čelenži budú zvieratá pravidelne 2x denne kontrolované, posudzovaný bude ich zdravotný stav a welfare. Príznaky, ako je zježená srst, neistá chôdza, chvenie a kríce v kombinácii s výraznou stratou hmotnosti, ktoré sú spoľahlivým indikátorom letálneho výsledku besnoty a môžu byť podľa Ph. Eur. a ECVAM používané ako neletálne body humánneho ukončenia. Zvieratá v štádiu prostrácie budú humánnne utratené cervikálnou dislokáciou, aby sa predišlo utrpeniu a bolesti. Zvieratá, ktoré prežijú čelenž, budú po 28. dňoch po čelenži humánnne usmrtené cervikálnou dislokáciou.

2. časť projektu - Sledovanie vplyvu beta-karoténu na antigénny účinok antirabickej adjuvantnej vakcíny

Zvieratá budú imunizované subkutánne jednorazovou aplikáciou, čo je zákrok krátky a nebolestivý a nevyžaduje si použitie analgetík.

**Celkový počet a typ zvierat:** myši – outbredné, kmeň ICR, 10-12 gramové (4-6 týždňové), samice, 250 jedincov + 85 = 335

**Dodržiavanie zásad 3 R:**

Alternatívne prístupy v testovaní antirabických vakcín sme overovali a budú vykonané na základe medzinárodných nariadení a smerníc WHO, OIE a European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), ako aj aktuálnej správy a odporúčaní ECVAM: „Three Rs Approaches in the Quality Control of Inactivated Rabies Vaccines“ (2003), výsledkov medzinárodného workshopu Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) a National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative

Toxicological Methods (NICEATM) z r. 2011: „Improving animal welfare and reducing animal use for human vaccine potency testing: state of the science and future direction“ z r. 2012: „Report on the international workshop on alternative methods for human and veterinary rabies vaccine testing: state of the science and planning the way forward“.

**Kategória krutosti:**

**1. Slabá až krutá:**

váženie - slabá krutosť,

fixácia – slabá krutosť,

subkutánne podanie vakcíny – slabá krutosť,

intraperitoneálna aplikácia vakcíny – slabá krutosť,

intraperitoneálne podanie sedatíva – slabá krutosť,

intracerebrálna aplikácia po sedácii - slabá krutosť,

testovanie účinnosti nového adjuvansu – slabá krutosť,

testovanie účinnosti vakcíny u zvierat po čelenži u ktorých dochádza k zhoršeniu zdravotného stavu vedúcemu k uhynutiu spojenému s neurologickými príznakmi – krutá krutosť

**Projekt bude späťne posúdený po skončení v súlade s § 37 bodom 2) NV 377/2012:**  
„Späťne sa posudzujú všetky projekty, v ktorých sa používajú primáty, a projekty, v ktorých sa využíva postup klasifikovaný ako „krutý“ ...“.

**Netechnické zhrnutie projektu:** *aktualizácia povolenia projektu  
a spôsobom používania*

**Názov projektu:**

Štúdium mechanizmov indukovej reaktivácie ľudských onkogénnych herpesvírusov na modeli latentne infikowanej myši s Myším gamaherpesvírusom

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 292/16-221c - *s pôvodné posúdením*

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):**

Myší gamaherpesvírus, MHV, epigenetická regulácia, latencia, reaktivácia

**Účel projektu<sup>\*</sup>:** 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

**Ciele projektu a prínos z vykonaného projektu:**

Myší gamaherpesvírus (MHV) je modelový vírus využívaný pre štúdium ľudských gamaherpesvírusov, vírusu Epstein-Barrovej a vírusu asociovaného s Kapošiho sarkómom, poskytujúc odpovede na aktuálne otázky vírusovej infekcie a reaktivácie z latencie, vrátane prípravy vhodných vakcín proti chronickej infekcii spájanej s lymfoproliferatívnymi ochoreniami a onkogenézou. Spolu bolo, v bývalom Československu, izolovaných osem myších gamaherpesvírusov, pomenovaných MHV -60, -68, -72, -76, -78, -4556, -5682 a -Šumava (reviewed by Mistríková et al., 2000). MHV-68, označovaný aj ako MuHV-4, je najlepšie charakterizovaný, známa je jeho kompletnejšia sekvencia genómu (Virgin et al., 1997) a slúži ako referenčný kmeň (reviewed by Kúdelová and Rajčáni, 2007). Doterajšie patogenetické štúdie potvrdili, že kmeň MHV-72 je *in vitro* veľmi podobný MHV-68, ale *in vivo* sa vyznačuje niektorými odlišnosťami (Rašlová et al., 1999, 2001; Mačáková et al., 2003; Valovičová et al., 2006; Belvončíková et al., 2008). Chronická infekcia s MHV-72, na rozdiel od MHV-68, vedie k vysokému výskytu lymfómov pečene, plúc a nadobličiek. Ten sa dokonca zvýšil, najmenej trikrát, u myší liečených imunosupresívami (Mistríková et al., 1999, 1996). Navýše bola popísaná replikácia MHV-72 v mliečnych žľazách a dokázaný prenos vírusu materským mliekom z infikowanej matky na potomstvo (Rašlová et al. 2001). V prvotných štúdiach boli popísané aj restrikčná mapa genómu MHV-72, sekvencie vybraných génon (tymidín kináza, M3 proteín, MK3 proteín, gp150). MHV-72, ale i ďalší kmeň MHV-4556, majú rôznu patogenitu a líšia sa minimálne v indukcii splenomegálie (Mistríková et al., 1996; Oda et al., 2005; Kúdelová et al., 2012; Halászová et al., 2011). Naše nedávne štúdie ukázali, že MHV-72 a MHV-4556 majú, oproti MHV-68, zníženú schopnosť navodiť latenci a *ex vivo* reaktiváciu indukovanú trichostatínom A (TSA) v slezine, plúcach a týmuse laboratórnych myší latentne infikovaných MHV-72 alebo MHV-4556 (Halászová et al., 2014). Kľúčovú úlohu

v týchto procesoch zohrávajú jednak vlastnosti vírusu kódované jeho genómom, ale aj hostiteľské faktory. Jedným z faktorov, ktoré majú rozhodujúci vplyv v regulácii latencie a reaktivácie vírusov, je chromatinizácia vírusového genómu a modifikácie histónov - epigenetická regulácia (Yang et al., 2009).

Doteraz, boli základné mechanizmy epigenetickej regulácie študované prevažne na transformovaných bunkových líniach, ktoré však neposkytujú reálny a komplexný obraz všetkých interakcií vírus-hostiteľ. Okrem toho, pre štúdium latencie a reaktivácie nie je v súčasnosti dostupná vhodná bunková línia. Doteraz je používaná len nádorová bunková línia S11E, ktorá však vykazuje vysokú frekvenciu spontanej reaktivácie MHV-68 (Usherwood et al., 1996; Yang et al., 2009). Relatívne nová bunková línia, nazvaná NB-78, derivovaná z cervikálneho lymfómu myší infikované s MHV-78 (Mistríková et al., 2006), sice neprodukuje infekčný vírus, ale latentne infikovaných je iba 1-2% jej buniek.

**Pre detailné štúdium mechanizmov epigenetickej regulácie latencie a reaktivácie myšieho gamaherpesvírusu (MHV) v kontexte vplyvu imunitného systému** na tieto udalosti je nevyhnutné navodiť latenciu u myší.

Plánujeme použiť tri kmene MHV, MHV-68 – referenčný kmeň, MHV-72 a MHV-4556, ktoré sa od seba odlišujú mierou navodenia latencie a schopnosťou reaktivácie (ako bolo spomenuté výšie). Predpokladáme, a predbežné *in vitro* testy nám to potvrdili, že rozdiely medzi týmito MHV kmeňmi v schopnosti navodiť latenciu a reaktiváciu by mohli byť spôsobené tkanivovo špecifickou epigenetickou reguláciou vírusového genómu. Okrem toho, aj miera reaktivácie a s ňou asociované interakcie vírusu s imunitným systémom, konkrétnie s interferónmi a nimi aktivovanými signálnymi dráhami, sú kmeňovo špecifické (Benkóczka et al., 2014).

V posledných piatich rokoch sa štúdiu epigenetickej regulácie expresie venuje veľká pozornosť. V odbornej literatúre je možné nájsť stovky citácií na podobnú tému. Jedinečnosť našich experimentov spočíva v tom, že máme k dispozícii dva unikátne kmene myšieho gamaherpesvírusu, MHV-72 a MHV-4556, ktoré, ako vyplynulo z našich doterajších štúdií, sa od prototypového kmeňa MHV-68 odlišujú v mnohých interakciách vírus-hostiteľ. Výsledky štúdií realizovaných v rámci projektu preto môžu napomôcť odhaleniu nových smerov v liečbe herpesvírusovej reaktivácie alebo eliminácií nádorov asociovaných s herpetickou chronickou infekciou.

#### **Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

Myš laboratórna Balb/c, inbred, samice

Plánovaný počet na celú dobu riešenia: 500ks

V prvej etape projektu bolo použitých: 101 ks

V druhej etape plánujeme použiť: 50 ks

Celkovo v projekte použijeme: 151 zvierat

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

Plánované experimenty: navodenie latentnej infekcie a indukcia reaktivácie vírusov *in vivo* zaraďujeme do kategórie krutosti postupov „slabé“, keďže myši budú infikované takou dávkou vírusu, ktorá im nespôsobí žiadne závažné zdravotné komplikácie a všetky aplikácie

(intranasálna infekcia a subkutánne aplikovanie TSA) budú robené v anestézii, pričom podaná „látka“, TSA, by nemala výrazne ovplyvňovať zdravotný stav zvierat.

Ani v jednom štádiu pokusu nebudú mať zvieratá obmedzený pohyb, ani obmedzený prísun potravy a vody. Zvieratá budú umiestnené v klietkach (max. 5 ks v jednej klietke) s vlastnou ventiláciou a označované budú skupinovými záznamovými kartami. Na konci experimentov budú zvieratá humánne usmrtené.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaradujeme do kategórie „slabé“.

### **Uplatňovanie zásad 3R**

#### **1. Nahradenie zvierat:**

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

Odozva organizmu na latentnú infekciu Myším gamaherpesvírusom (MHV), najmä ak sa sleduje reakcia organizmu na reaktiváciu vírusu, je komplexný proces, na ktorom sa podieľa veľa hostiteľských faktorov a práve preto sa v tomto prípade nedá „*in vivo*“ nahradíť bunkovými kultúrami. To dokazuje aj fakt, že hoci existujú dve latentne infikované bunkové línie, S11 a NB-78, tie vzhľadom na svoje vlastnosti a ako už bolo potvrdené v odbornej literatúre nie sú univerzálne vhodným modelom pre štúdium latencie a reaktivácie MHV. Okrem toho štúdium latencie a reaktivácie na bunkových kultúrach nezohľadňuje významný činiteľ ovplyvňujúci tieto procesy, a to je imunitný systém hostiteľa.

#### **Podľa zoznamu registra alternatívnych metód z European Centre for the Validation of Alternative Methods:**

[ecvam.jrc.it/-2k](http://ecvam.jrc.it/-2k); [ecvam.jrc.it/publication/MAb\\_statement.pdf](http://ecvam.jrc.it/publication/MAb_statement.pdf); [ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k](http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/-2k); [http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf\\_2006.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/conf_2006.htm); <http://tsar.jrc.ec.europa.eu/>; [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/publication/epaa\\_workshop\\_wg3.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/publication/epaa_workshop_wg3.pdf);

analýza patogenézy latentnej infekcie spôsobenej myším gamaherpesvírusom **nie je možná** bez modelového systému a je nevyhnutné použiť vhodný zvierací model. V tomto prípade je možné použiť myš.

Vzhľadom na nevyhnutnosť použitia laboratórnych zvierat sa v projekte sleduje a uplatňuje najnovšia legislatíva v súvislosti so smernicami o použití zvierat na vedecké účely, ktorú uzákonil Európsky parlament vo forme revidovanej smernice 2010/63/EU o zvieratách používaných na vedecké účely, ktorá nadobudla účinnosť 1. januára 2013, ako aj Nariadenie Vlády Slovenskej republiky zo 14. novembra 2012, ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely (Zbierka zákonov č. 377/2012) a Vyhláška č.436/2012 Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky zo 14. decembra 2012, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o požiadavkách na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely.

Nové právne predpisy prísne dbajú na dodržiavania pravidiel troch R (replacement, reduction, refinement) (t.j. nahradenie, obmedzenie a zmiernenie testov na zvieratách), t.j. aby sa minimalizoval počet zvierat používaných na pokusy a aby sa vždy, keď je to možné, využívali alternatívne metódy, a aby sa v prípade, keď nie je možné použiť alternatívne metódy, zlepšili a zjemnili metódy v postupoch, pri ktorých sa odstráni alebo obmedzí na najnižšiu mieru bolest, utrpenie, strach alebo trvalé poškodenie zvierat.

## 2. Redukcia počtu zvierat:

Pre štatistickú reprodukovanosť výsledkov a na základe našich dlhoročných skúseností je potrebné, aby každá vyšetrovaná skupina v každom časovom intervale obsahovala minimálne 5 ks myší. Plánovaný počet zvierat je preto 151 ks. Opakovania postupov obmedzíme na nevyhnutné minimum a budú sa vykonávať len v prípade potreby overenia sporných výsledkov.

## 3. Zjednenie:

Každodennú starostlivosť o zvieratá v pokusoch bude vykonávať školený personál - pracovníci pokusného zariadenia.

Vychádzajúc z klasifikácie krutosti postupov, postupy ktoré budeme vykonávať na zvieratách v plánovaných pokusoch zaraďujeme do kategórie „slabé“:

Myši budú infikované intranazálne v ľahkej inhalačnej anestéze a takou dávkou vírusu, ktorá im nespôsobí žiadne závažné zdravotné komplikácie. Jediným invazívnejším zákrokom, ktorý zvieratá podstúpia je subkutánne podanie TSA, pričom podaná „látka“ by nemala žiadnym spôsobom ovplyvňovať zdravotný stav zvierat.

Projekt bol po prvej etape späťne posúdený, bol znížený a presne definovaný počet zvierat, krutosť bola klasifikovaná ako „slabá“.

Projekt bude po skončení druhej etapy podliehať opäťovnému schvaľovaniu:    áno    nie

Príloha č. 2 : 1196/14-224

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

Názov projektu:

Overenie pevnej liekovej formy Biomin H (Calcii carbonas ex testae ovi) a /alebo v kombinácii s vitamínom D<sub>3</sub> a vitamínom K<sub>2</sub> na vývoj osteoporózy na modeli ovarektomizovaných potkaníc.

### a) Informácie o cieľoch projektu vrátane predpokladanej ujmy a prínosu, počte a typoch zvierat.

Cieľom projektu bude overenie účinnosti pevnej liekovej formy (tbl, cps.) z prášku získaného ekologickým spracovaním vaječnej škrupiny inovatívnymi technologickými postupmi (BIO) pre liečbu osteoporózy na štandardnom zvieracom modeli ovariekтомovaných potkaníc. Efekt na minerálny metabolizmus kostí bude sledovaný a porovnávaný po aplikácii látok: prírodný vápnik vyrobený z vaječných škrupín a kommerčne predávaný vápnik vo forme chemicky pripraveného uhličitanu vápenatého samostatne, resp. v kombinácii s vitamínom D<sub>3</sub> alebo vitamínom K<sub>2</sub>, ktoré sú súčasťou liečebných postupov pri osteoporóze.

Potkany sa podrobia operácií v celkovej i lokálnej anestézii. Pooperačný stav a doba pozorovania 56 dní sú optimálne pri eliminácii nepriaznivých vplyvov na zdravie zvierat denným podávaním analgetika. Testované látky budú zamiešané do kŕmnej zmesi a vylúči sa individuálna aplikácia sondou zvieratám.

Predpokladáme, že ujma na použitých zvieratách bude v prvých troch dňoch po operácii, kedy sa uskutoční proces hojenia vnútorného poranenia a incíznej rany na koži. Počas všetkých úkonov sa bude eliminovať stres a utrpenie podaním celkovej anestézie a dennej aplikácií analgetík. Z hľadiska bezpečnosti účinnosti budúccho zdravotného prostriedku pre človeka prínos projektu výrazne prevyšuje ujmu u experimentálnych zvierat.

Očakávaným prínosom projektu bude vývoj účinných látok farmakologicky využiteľných v prevencii a liečbe ľudí s ochorením kostného tkaniva spojeného s osteoporotickými zmenami vplyvom narušenia hormonálnej homeostázy, resp. znížiť riziko zlomenín kostí v rizikových skupinách ľudí.

V projekte sa použije celkom 100 zvierat (dospelých laboratórnych potkanov, samíc, kmeňa Sprague Dawley). Experimentálnym jedincom pred usmrtením nebudú aplikované žiadne cudzorodé látky. Testované látky neprídu do kontaktu so živými zvieratami.

Experimentálny model u potkaníc sa vyvolá bilaterálnou ovariektoziou. Po druhom mesiaci sa budú sledovať symptómy osteoporotických zmien. SHAM kontrolným a ovariekтомovaným zvieratám v liečených skupinách bude počas celého experimentu (56 dní) podávané každý deň upravené krmivo s prídavkom testovaných zlúčenín pracovníkom s dlhodobou praxou.

Celkovo v postupe budú vykonávané práce na zvieratách pri strednej úrovni krutosti podľa klasifikácie krutosti postupov. Váženie zvierat, aplikácia anestézie, analgetika, antibiotika intramuskulárne sa hodnotia ako slabo kruté. Operácia, pooperačný stav, vyberanie stehov po zákroku, odber krvi z retroorbitálneho sínusu v celkovej anestézii a odber moču v metabolickej kliecku budú na strednej úrovni krutosti.

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

### *Zásada nahradenia živých zvierat (replacement)*

Animálny model osteoporózy sa štandardne používa pri sledovaní účinkom potenciálnych látok ovplyvňujúcich minerálny metabolizmus kostí. V medzinárodných databázach (ECVAM, NC3R) sa zistovali alternatívne metódy, ktoré by nahradili použitie experimentálnych zvierat. V súčasnej dobe neexistuje validovaná alternatívna metóda testovania látok s antiosteoporotickými vlastnosťami prípravkov použiteľných v medicíne u živých organizmov. Potkan laboratórny je systematicky najnižšie postavený druh vhodný pre posúdenie účinkov zdravotníckeho produktu v mieste jeho podania.

### *Zásada obmedzenia počtu zvierat (reduction)*

Projekt je plánovaný s minimálnym počtom experimentálnych potkanov tak, aby neboli ohrozený cieľ projektu a bola zabezpečená reprodukateľnosť i validita postupu pre biochemické, hematologické, makroskopicko-morfologické, histologické analýzy, ako aj ich štatistiké vyhodnotenie. Zvieratá budú samičieho pohlavia, rovnakého veku, resp. hmotnosti, aby sa zabránilo vysokému rozptylu nameraných hodnôt a tým štatisticky nesignifikantným výsledkom. Z dôvodu šetrenia zvierat nebudú zaradené zvieratá bez vápnikového prídatku do krmiva, pretože údaje o osteoporotických zmenách sú už známe a nie sú nutné pre hodnotiaci proces v tomto projekte.

### *Zásada zjemnenia (refinement)*

Zvieratá budú po privezení z chovného zariadenia v karanténe. Po dobu 7 dní sa umiestnia po štyri v dostatočne veľkých vaniciach (rozmery 58x37x20cm) za stanoveného svetelného, tepelného a kŕmneho režimu. Po operačnom zásahu sa ustajnia individuálne, aby sa zamedzilo vytrhnutiu stehov, narušeniu hojaccho procesu i prijímania krmiva v prípade napádania slabších jedincov agresívnejšími. Na zabránenie vzniku pooperačných zápalových reakcií sa použije antibiotikové krytie počas prvých troch dní. Operačné zákroky budú vykonávané skúseným odborným pracovníkom s dlhorocnou praxou. Potkanice počas postupu prežijú výraznejší stres v operačnom a pooperačnom období, ktorý budeme minimalizovať podaním anestetík a analgetík. So zvieratami sa bude zaobchádzať šetrne a prostredie vanice sa obohatí predmetmi na hru a ohryzovanie. Pri odbere moču v metabolických klietkach sa stres zmierní minimálne nutným pobytom v zariadení (max. 4 hodiny) s prístupom ku krmivu a vode bez obmedzenia, šetrným i ohľaduplným zaobchádzaním so zvieratami. Eutanázia sa vykoná bezbolestne v hlbokej celkovej anestézii.

Projekt bude podliehať opäťovnému schvaľovaniu:      **nie**