

Forma patvirtinta
Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos
direktoriaus 2013 m. lapkričio 25 d.
įsakymu Nr. B1-761

(Bandymo su gyvūnais projekto santraukos formos pavyzdys)

**BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTO SANTRAUKA /
NON-TECHNICAL SUMMARY OF THE PROJECT FOR EXPERIMENTS ON ANIMALS**

1. Projekto pavadinimas / Project Title	<p><i>Alogeninio sąnario kremzlės ir kaulo komplekso transplantacijos poveikis kremzlės regeneracijai eksperimentiniame kremzlės pažeidimo modelyje (CHONDRO)</i></p> <p><i>The effect of osteochondral allotransplantation on articular cartilage regeneration in experimental model of cartilage damage (CHONDRO)</i></p>		
2. Projekto trukmė / Duration of the Project	2013 – 2015 metai 2013-2015 year		
3. Reikšminiai žodžiai (ne daugiau kaip 5) / Key words (maximum 5)	sąnario kremzlė, transplantacija, regeneracija, eksperimentinis modelis articular cartilage, transplantation, regeneration, experimental model		
4. Projekto tikslas (-ai) / Purpose of the Project		TAIP/ YES	NE / NO
4.1. Fundamentaliųjų mokslinių tyrimų tikslai / Purpose related to basic research		taip yes	
4.2. Aiškinamųjų ar taikomųjų mokslinių tyrimų tikslai / Purpose related to translational and applied research		taip yes	
4.3. Vaistų, maisto, pašarų ir kitų medžiagų ar produktų kūrimo, gamybos, kokybės, veiksmingumo ir saugumo tikrinimo tikslai siekiant išvengti žmonių ir gyvūnų ligų ar sveikatos sutrikimų atsiradimo, augalų ligų arba kitų anomalijų atsiradimo ar jų poveikio, užtikrinti ligų prevenciją, diagnozavimą ar gydymą, įvertinti, nustatyti, kontroliuoti ar pakeisti žmonių, gyvūnų arba augalų fiziologinę būklę ar gerinti gyvūnų gerovę / Purposes related to the control of pharmaceuticals products, food, feed or other materials or the development, production, quality, efficiency and safety of products seeking to prevent human or animal diseases or their health disorders, plant diseases or other abnormalities or their impacts to ensure the prevention of diseases, their diagnosis or treatment, to assess, identify, control or change the physiological condition of humans, animals or plants or improve the animal welfare.			
4.4. Gamtinės aplinkos, reikalingos žmonių ar gyvūnų sveikatai ar gerovei, apsaugos tikslai / Purposes related to the protection of natural environment in the interests of health or welfare of human beings or animals			
4.5. Mokslinių tyrimų tikslai siekiant atitinkamos rūšies išsaugojimo / Purposes of scientific research seeking the preservation of a certain species			
4.6. Aukštojo mokslo ar mokymo tikslai siekiant įgyti ar pagilinti profesines žinias, kelti kvalifikaciją / Purposes related to higher education or training aimed at gaining or deepening professional knowledge or improving qualifications			
4.7. Kriminalinių tyrimų tikslai / Purposes related to forensic investigations			
4.8. Tam tikros būklės genetiškai modifikuotų gyvūnų, nenaudojamų kitose procedūrose, linijos sukūrimo ir išlaikymo tikslai / Purposes related to the development and maintenance of a colony of genetically altered animals of a certain condition not used in other procedures			
5. Projekto tikslų aprašymas / Description of the objectives of the Project	<p>1. Įvertinti alogeninio sąnarinės kremzlės-kaulo komplekso (KKK) tinkamumą transplantacijai.</p> <p>1.1. Ištirti chondrocitu gyvybingumą KKK, kuris bus</p>		

laikomas skirtingose temperatūrose (-70°C, 4°C ir 37°C), skirtingos sudėties maitinamoje terpėje ir skirtingą laikotarpį (14 ir 28d.).

- 1.2. Atsižvelgiant į pilotinio tyrimo rezultatus, atlikti gyvų/negyvų ląstelių mėginį, transplantuojant kremzlės ir kaulo alotransplantatą.
 - 1.3. Vertinti morfologinius pokyčius dažant Safranin O (dėl proteoglikanų).
 - 1.4. Atlikti TUNEL mėginį (dėl apoptozės)
- 2. Įvertinti sąvarinės kremzlės regeneracijos efektyvumą po KKK transplantacijos panaudojant autologinį ir gyvybiškiausių alogeninį transplantatą, laikytą atitinkamomis sąlygomis.**
- 2.1. Atlikti KKK transplantaciją ožiukams ir juos stebėti 6 mėnesius po operacijos.
 - 2.2. Artroskopiškai įvertinti sveikos ir regeneravusios po 3 ir 6 mėnesių kremzlės biomechanines savybes.
 - 2.3. Ištirti kremzlės regeneracijos morfologines, histologines ir imunohistochemines charakteristikas po 3 ir 6 mėnesių
 - 2.4. Makroskopinis integracijos į sveiką audinį ir kremzlės kietumo vertinimas.
 - 2.5. Morfologinių pokyčių vertinimas dažant Safranin O dažymas (dėl proteoglikanų).
 - 2.6. II ir X tipo kolageno nustatymas antikūnų pagalba.
 - 2.7. Kompleksinis regeneracijos vertinimas pagal atitinkamą histologinę skalę.
- 3. Įvertinti sąvarinės kremzlės regeneracijos efektyvumą po kaulinio kremzlinio komplekso (KKK) transplantacijos papildomai naudojant frakcionuotos plazmos komponentus.**
- 3.1. Atlikti KKK transplantaciją ožiukams, operacijos metu suleisti autologinę šviežiai frakcionuotą plazmą ir ožiukus stebėti po operacijos 6 mėnesius.
 - 3.2. Artroskopiškai įvertinti sveikos ir regeneravusios po 3 ir 6 mėnesių kremzlės biomechanines savybes.
 - 3.3 Ištirti kremzlės regeneracijos morfologines, histologines ir imunohistochemines charakteristikas po 3 ir 6 mėnesių.
 - 3.4 Makroskopinis integracijos į sveiką audinį ir kremzlės kietumo vertinimas.
 - 3.5 Morfologinių pokyčių vertinimas dažant Safranin O dažymas (dėl proteoglikanų).
 - 3.6 II ir X tipo kolageno nustatymas antikūnų pagalba

Aim1. Investigate the suitability of allograft for transplantation and determine optimal allograft storage conditions.

The objective of aim 1 is to evaluate chondrocyte viability in osteochondral allografts stored at different temperature (-70°C, 4°C and 37°C), different medium (DMEM and DMEM +IGF1), and for different period of time (14 days and 28 days). To achieve this goal we will perform Live/Dead cell staining, Safranin O or DMMB staining for proteoglycan content, and TUNEL staining for apoptosis.

Aim 2. Evaluate the long-term outcome of cartilage regeneration using most viable allograft stored under most appropriate storage conditions.

The objective of aim 2 is to evaluate long-term in vivo performance of osteochondral allograft and autograft in skeletal mature goats. We will create an osteochondral defect in the medial condyle of the femur in both hindlims and perform osteochondral transplantation using most viable allograft as determined in aim 1 and autograft. We will monitor animals for 6 month after surgery. After 3 and 6 month we will evaluate biomechanical properties of

	<p>normal and repair site cartilage by measuring streaming potential which reflects stiffness, composition, structure and thickness of cartilage. We will evaluate the repair site macroscopically and collect regenerated cartilage samples for histological and immunohistochemical analysis. We will perform Safranin O staining for proteoglycan expression and immunostaining for type II and X collagen. We will use histological grading scale for the qualitative assesment of cartilage healing.</p> <p>Aim 3. Evaluate the long term outcome of cartilage regeneration using allograft transplantation in combination with intraarticular autologous PRP administration.</p>
<p>6. Numatoma projekto nauda (t. y. kokia numatoma nauda atlikus projektą mokslui, gyvūnams ir (ar) žmonėms) / Potential benefits likely to derive from the Project (i. e. how science could be advanced or humans or animals could benefit from the project)</p>	<p>Artroskopinių operacijų metu 80% pacientų randama įvairaus laipsnio ir lokalizacijos sąnario kremzlės pažeidimų. Net ir nedideli sąnario kremzlės defektai smarkiai sumažina žmonių, ypač sportuojančiųjų asmenų, darbingumą, apriboja jų judrumą bei inicijuoja osteoartrito vystymąsi. Ląstelinės kremzlės terapija ir kremzlės auginimas laboratorinėmis sąlygomis yra labai brangus metodas. Klinikinėje praktikoje taikomas trumpesnis laiko atžvilgiu ir pigesnis, gydymo metodas, kuris pagrįstas sąnario kremzlės ir kaulo komplekso transplantacija. Atlikti tyrimai parodė, kad sportininkams po tokio tipo operacijų sąnario funkcija atsistato greičiau nei taikant ląstelinės terapijos metodus. Klinikinėje praktikoje susiduriama su situacijomis, kuomet nėra galimybės atlikti kremzlės ir kaulo autotransplantaciją. Literatūroje trūksta duomenų apie galimybę atlikti šviežio ir išlaikyto sąnario kremzlės ir kaulo kompleksų alogenines transplantacijas, kaip naują ir pažangų gydymo būdą.</p> <p>Šiuo projektu bus siekiama ištirti sąnario kremzlės ir kaulo gyvybingumą, nustatant optimalias transplantato laikymo sąlygas, remodeliaciją, kremzlės biomechanines savybes, vertinat jos kietumą sveikoje ir transplantuotoje kremzlėje, imunines reakcijas po alogeninės transplantacijos sąnaryje ir įvertinti pritaikomumo galimybes įvairių klinikinių situacijų metu gydant sąnario kremzlės ir kaulo defektus. Alogeninio kremzlės ir kaulo transplantato prigijimo galimybės, funkcinės ir biomechaninės savybės, morfologija vertinama imunohistocheminiu būdu. Gauti rezultatai leis įvertinti transplantuoto kremzlinio kaulinio audinio struktūros pokyčius taikant pasirinktą gydymo metodą. Taip pat bus vertinama autologinės frakcionuotos plazmos regeneraciją skatinančių medžiagų įtaka atokesiems transplantacijos rezultatams. Eksperimentų metu bus vertinama chondrocitų ir tarpląstelinės medžiagos matrikso savybės ir gyvybingumas.</p> <p>Pasitelkus projekto įgyvendinime dalyvaujančių dalyvių patirtį bus siekiama sukurti naują gydymo būdą, naudojant šaldytus alogeninius transplantus ir parenkamas tinkamiausias gydymo algoritmas tikslu sumažinti Lietuvos PSDF išlaidas, sąlygotas jaunų žmonių invalidizacijos. Lietuvoje pagamintu PTV bus gydomi sunkius kelio sąnario pažeidimus turintys asmenys, tuo gerinant jų gyvenimo kokybę, lėtinant arba sustabdant osteoartrito vystymąsi bei endoprotezavimo poreikį.</p> <p>Moksliniai tyrimai atlikti su sportuojančiais asmenimis parodė, kad dažnai osteoartrito priežastys yra įvairios kilmės kelio sąnario kremzlės ir kaulo pažeidimai po traumos, kelio nestabilumas ar apkrovimas pernelyg dideliu svoriu. Literatūros duomenimis po sąnario kremzlės ir kaulo autotransplantacijų sportuojantys asmenys grįžta į aktyvų sportinį gyvenimą greičiau ir su aukštesniais gyvenimo kokybės rodikliais, turinčiais įtakos sportinių rezultatų siekimui, negu taikant ląstelinės terapijos metodus. Remiantis literatūra sąnario kremzlės pažeidimai sudaro ~6 atvejai 10 tūkst. žmonių. Viena iš trijų dažniausių invalidumo priežasčių pasaulyje yra osteoartritas. Visa tai sukelia sąnario kremzlės ir kaulo</p>

pažeidimą, kuriam būdingas riboto ploto kremzlės ir/ar pokremzlinio kaulo atsiskyrimas nuo šalia esančios sveikos kremzlės ar kaulo. Laikui bėgant, prasideda degeneraciniai – negrįžtami procesai, kurie baigiasi osteoartritu ir invalidumu. Tuomet neišvengiamai reikalinga endoprotezavimo ar kita sudėtinga ir rizikinga operacija. Šnario kremzlė yra kraujotakos ir inervacijos neturintis audinys. Pažeidus šnario kremzlę šis audinys turi labai ribotas (arba jų visai nėra) natūralias savaiminio pagijimo galimybes, lyginant su kitais mezenchiminiais audiniais. Dėl tokių prastų šnarinės kremzlės savaiminių regeneracinių savybių (mažas kiekis specializuotų ląstelių ir menko jų mitotinio aktyvumo), kremzliniai pažeidimai dažnai pereina į pagrindinę ligą - osteoartritą.

Atlikus literatūros apžvalgą, vis dar trūksta duomenų apie kremzlės ir kaulo alotransplantacijas, lieka neaišku, kokiomis sąlygomis optimaliausiai alotransplantą saugoti iki operacijos siekiant optimaliausios regeneracijos ir integracijos į sveiką audinį bei aukščiausių gydymo rezultatų.

Iki šiol nėra vieningos nuomonės kaip tiksliai gydyti šnario kremzlės ir kaulo patologiją, nuolat ieškoma naujų vaistų bei operacinio gydymo metodų. Šiuo metu pasaulyje ir Lietuvoje taikoma vienintelė radikali autologinė kremzlės ir kaulo transplantacija, kurios metu kremzlės ir kaulo transplantas visais atvejais imamas iš to paties žmogaus kitų to paties šnario vietų, dėl ko atsiranda trumpalaikės ar ilgalaikės donorinės šnario vietos ligos požymiai, kurie vėliau taip pat gali sukelti degeneracinius pokyčius bei apriboti sportuojančiųjų žmonių aktyvumą.

Mūsų mokslinio tyrimo idėja būtent ir grindžiama tyrimų stoka, panaudojant komplekso transplantacijai optimaliausiomis sąlygomis laikytą šnario kremzlės ir kaulo alogeninį kompleksą. Be to, nėra nagrinėti ir tirti tokio pobūdžio pooperaciniai struktūriniai pokyčiai ir remodeliacijos integracijos į sveiką audinį ypatumai, galimybė stimuliuoti regeneracijos ir prigijimo procesus naudojant autologinę frakcionuotą plazmą.

Research conducted in athletes showed that frequent causes of osteoarthritis are various lesions of knee cartilage and bone after traumatic injury, knee instability or excessive load bearing. According to the published results when comparing to chondrocyte transplantation after autologous osteochondral transplantation athletes are able to return to active sports life faster and with higher indicators of quality of life that can highly affect further performance of an athlete. According to the 10 thousand people. Osteoarthritis is one of the three most common causes of disability in the world. The traumatic injuries lead to cartilage and bone disease, characterized by the separation of the limited area of cartilage and / or bone from the adjacent healthy cartilage or bone. Over time, the degenerative changes develop - an irreversible process, which ends with osteoarthritis and disability. That inevitably requires complex symptomatic treatment that usually ends up with the joint replacement. Articular cartilage has no blood supply and innervation, therefore it has a very limited (or no) of natural self-cure capabilities when compared with other mesenchymal tissues. Due to very poor articular cartilage spontaneous regenerative properties (a small amount of specialized cells and their low mitotic activity), cartilage lesions often goes to the underlying disease - osteoarthritis. Currently there is no treatment algorithm and lack of research data in the literature on osteochondral allograft transplantation. It remains unclear under what conditions (storage temperature, media composition, storage duration) allograft should be stored before transplantation for effective, long lasting and functional integration of the allograft into the healthy cartilage tissue. There are no reports

regarding the use of platelet-rich plasma in combination with the allograft to treat articular cartilage damage.

7. Projekte numatomos naudoti gyvūnų rūšys ir preliminarus gyvūnų kiekis (vnt.) / *Expected species and approximate numbers of animals to be used in the Project (in numbers)*

I ETAPAS. *Naudojami ožiukai iki 4 mėn amžiaus. Operuojami steriliomis sąlygomis, imami transplantai ir laikomi tokiomis sąlygomis:*

Laikymo sąlygos / dienos	DMEM		DMEM + IGF1 (100 ng/ml)	
	14	28	14	28
-70°C	5	5	5	5
4°C	5	5	5	5
37°C	5	5	5	5

Vertinamas kremzlės kietumas, biomechaninės sąvybės. Atliekami gyvybingumo tyrimai, tiriama ląstelių apoptozė, mėginiai dažomi Safranin O, tiriami histologiškai.

II etapas. *Auginami ožiukai iki 6 mėn. amžiaus (nes tokio amžiaus ožiukai yra vertinami kaip suaugę), vėliau operuojami.*

Darbo laikas	Eksperimentinio tyrimo pogrupis	Operacijos pobūdis	Papildomi veiksmai
I mėnuo	I Autologinė kontrolinė	Autologinė kremzlės ir kaulo transplantacija („šviežia“)	Paimama dalis transplantato, laikoma optimaliausiomis nustatytomis sąlygomis
I mėnuo	II Alogeninė (šviežia)	Alogeninė kremzlės ir kaulo transplantacija („šviežia“)	
I mėnuo	III Alogeninė su optimaliausiomis sąlygomis išlaikytais transplantatais	Alogeninė kremzlės ir kaulo transplantacija,	

We will follow the ethical guidelines of animal research and care. We will use 44 skeletal mature goats (6 month of age) for all experiments listed below. Initially, 4 goats will be used for collection of osteochondral grafts that will be stored under different storage conditions and evaluated for chondrocyte viability. 10 samples (5 samples per group) will be fresh-frozen and stored at -70°C for 14 or 28 days. 20 samples (5 samples per group) will be stored in DMEM at 4°C or 37°C for 14 or 28 days. 20 samples (5 samples per group) will be stored in DMEM +IGF1(100 ng/ml) at 4°C or 37°C for 14 or 28 days. This part of in vitro study is necessary to evaluate the effect of different storage conditions on chondrocyte viability that is critical for the graft long-term in vivo performance. We will perform Live/Dead cell staining, Safranin O or DMMB staining for proteoglycan content, and TUNEL staining for apoptosis. During the next step the remaining 40 goats will be divided into two groups (20 in each group). In group 1 we will perform osteochondral transplantation according to the following scheme. Briefly, 18 animals (36 legs) will be operated. Defects created on the right knees of the 12 animals will receive osteochondral autografts harvested from the left knees, while the defects on the

	<p>left knees will receive fresh allografts harvested from both knees of another 6 animals. These 6 animals (12 knees) will receive osteochondral allografts stored under most appropriate storage conditions for maximum chondrocyte viability that have been determined in a previous set of experiments. 9 animals from the group 1 will be euthanized after 3 months, another 9 animals will be euthanized after 6 months. 2 extra animals are requested in case of intraoperative and postoperative complications. In group 2 we will perform osteochondral transplantation in a similar fashion, however, in this experimental group we will inject autologous PRP immediately after surgery and after 1 and 2 month postoperatively.</p> <p>Animals will be euthanized after 3 and 6 month. At the time of euthanasia we will perform gross macroscopic examination of the repair site and evaluate biomechanical properties of the regenerated cartilage. We plan to use a medical device (Arthro-BST) that could be used in conjunction with arthroscopic procedures for the quantitative evaluation of articular cartilage. The instrument measures streaming potentials generated during gentle compression of the articular cartilage and calculates a quantitative parameter reflecting its electro-mechanical properties. We will measure streaming potential of the repair site cartilage and compare it to the streaming potential of the healthy articular cartilage. We will harvest osteochondral samples from each cartilage repair site and perform histologic and immunohistochemical evaluation. We will use hematoxyllin and eosin staining, Safranin O staining and perform immunostaining for type II and type X collagen. The morphology of the cartilage at the repair site, remodeling and integration into surrounding tissues.</p>
<p>8. Numatomas poveikis gyvūnui (-ams) atsižvelgiant į planuojamas bandymo su gyvūnais procedūras (t. y. kokį galimą skausmą ar kančias galimai patirs gyvūnas ir koks numatomas bandymo su gyvūnais procedūrų užbaigimo būdas) / <i>The expected effects on an animal(s) in the context of the projected procedures of experiments on animals (i. e. expected level of severity of pain or suffering to be likely experienced by an animal and what is the expected way of finalising the procedures of experiments on animals)</i></p>	<p>Gyvūnai prieš eksperimentą pristatomi į laikymo patalpas (LSMU VA Stambiųjų gyvūnų klinika) prieš 3-4 paras adaptacijai. Prieš eksperimentą pusę paras nemaitinami ir negirdomi, adaptuojami specialiose operacinės patalpose, vėliau seduojami ir ruošiami eksperimentinei procedūrai atlikti.</p> <p>Anestezija: Ketamidor 10%-10 ml; Relanium 10 mg/2 ml; Xylazin 2%;1 (i/v). Dozė titruojama individualiai. Atliekama viso eksperimento metu ir 1-2 parą po intervencijos, stebint būklę ir atliekant reabilitacinį gydymą. Stebėjimas atliekamas monitoruojant gyvūno būklę.</p> <p>Miorelaksacija: Sol. Arduan 4 mg/kg/2 val.</p> <p>Infekcijų kontrolė: gyvūnams atliekamas gydymas antibiotikais, pradedant įvadinės narkozės metu, tokiu būdu išvengiant galimos žaizdos supuracijos.</p> <p>Before the experiment, the animals are delivered to storage facilities (Large Animal Clinic LSMU VA) 3-4 days adaptation. Half of the day before the experiment, animals adapted for special operating rooms, after primary sedation are subsequently prepared for an experimental procedure.</p> <p>Anesthesia: Ketamidor 10%-10 ml; Relanium 10 mg/2 ml; Xylazin 2%; (1) (i/v). Dose titration on an individual basis. Is carried out in full at the time of the experiment, and the 1-2-hour after intervention, monitoring the situation and in the rehabilitation treatment. Tracking is done under monitoring the condition of the animal.</p> <p>Miorelaxation: Sol. Arduan 4 mg/kg/2 Infections control: for animals is carried out by antibiotic treatment, starting with the introduction of anesthesia time, thus avoiding possible supuration.</p>
<p>9. Projekto vertinimas atgaline data (jeigu reikalingas vertinimas atgaline data, nurodyti, iki kada jis turi būti atliktas) / <i>Retrospective assesment of the project (if the retrospective assesment is needed the deadline has to be specified)</i></p>	
<p>10.</p>	<p>Reikalavimų mažinti bandomųjų gyvūnų skaičių bandymo su gyvūnais procedūroms, gerinti bandomųjų gyvūnų naudojimo sąlygas ir taikyti metodus, leidžiančius pakeisti bandomųjų gyvūnų naudojimą bandymo su gyvūnais procedūroms alternatyviais metodais, įgyvendinimas /</p> <p>Gyvūnų skaičius pagal projekto uždavinius pasirinktas optimaliai, mažinti jų kiekį ar galvoti apie galimybes tai padaryti</p>

ateityje šiuo metu negalima, nežinant galimų specifinių atlikimo subtilumų. Be abejonės, nustačius, kad eksperimento rezultatai atsikartoja, atsirastų galimybė sumažinti gyvūnų kiekį. Jei projekto vykdymo eigoje tai bus nustatyta, tai ir bus padaryta. Alternatyvūs metodai bendrąja prasme nelabai įmanomi, kadangi juos riboja procedūros techninės galimybės. Tačiau šiuo aspektu numatyta mažinti gyvūnų skaičių, atliekant kiek galima maksimaliai procedūrų skaičių vienam gyvūniui, optimizuojant metodologinius aspektus.

Implementation of the requirements for the reduction of the number of animals used in procedures of experiments on animals, refinement of conditions under which animals are used for the procedures and application of methods, which enable the replacement of the use of animals in the procedures by alternative methods./ The number of animals in accordance with the objectives of the project chosen optimally, to reduce their emissions or to think about the opportunities to do so in the future is not currently available, without knowing the specific procedures availability. Without a doubt, that the results of the experiment duplicated the possibility of reducing the number of animals. If during the execution of the project it will be found that will be done. Alternative methods within the meaning of the common lowpossibilitesi, whereas limited by the technical feasibility of the procedure. However, to reduce the number of animals referred to in this respect, as far as possible to maximize the number of procedures per animal, optimising the methodological aspects.

10.1. Gyvū bandomųjų gyvūnų naudojimo ir alternatyvių metodų nenaudojimo reikalavimo taikymo pagrindimas / *Justification for using live animals and for not using alternative methods*

Gyvūnų kančios bus eliminuojamos ar sumažinamos iki minimumo optimaliai taikant anestezijos ir analgezijos metodikas, tam panaudojant konkrečiai gyvūnų rūšiai pagal geros eksperimentinės praktikos reikalavimus nuskausminimui, reabilitacijai ir terapijai skirtus farmakologinius preparatus bei priemones.

Animal suffering will be eliminated or reduced to a minimum for optimum application of anesthesia and analgesia, using in particular the species in accordance with the requirements of anesthesia of good experimental practices, rehabilitation and therapy or pharmacological preparations and measures to allocate the excess.

10.2. Bandomųjų gyvūnų skaičiaus mažinimo reikalavimo taikymo pagrindimas / *Justification of the reduction of the number of animals*

Gyvūnų skaičius pagal projekto uždavinius pasirinktas optimaliai, mažinti jų kiekį ar galvoti apie galimybes tai padaryti ateityje šiuo metu negalima, nežinant galimų specifinių atlikimo subtilumų. Be abejonės, nustačius, kad eksperimento rezultatai atsikartoja, atsirastų galimybė sumažinti gyvūnų kiekį. Jei projekto vykdymo eigoje tai bus nustatyta, tai ir bus padaryta. Alternatyvūs metodai bendrąja prasme nelabai įmanomi, kadangi juos riboja procedūros techninės galimybės. Tačiau šiuo aspektu numatyta mažinti gyvūnų skaičių, atliekant kiek galima maksimaliai procedūrų skaičių vienam gyvūniui, optimizuojant metodologinius aspektus.

The number of animals in accordance with the objectives of the project chosen optimally, to reduce their emissions or to think about the opportunities to do so in the future is not currently available, without knowing the specific procedures available. Without a doubt, that the results of the experiment duplication the possibility of reducing the number of animals. If during the execution of the project it will be found that will be done. Alternative methods within the meaning of the common low-possible, whereas is limited by the technical feasibility of the procedure. However, to reduce the number of animals referred to in this respect, as far as possible to maximize the number of procedures per animal, optimizing the methodological aspects.

10.3. Bandomųjų gyvūnų naudojimo sąlygų gerinimo reikalavimo taikymo pagrindimas / *Justification of the refinement of conditions under which animals are used*

Optimizuotas planas, kaip maksimaliai sumažinti bandomųjų gyvūnų skaičių pateiktas aukščiau. Gyvūnų skaičiaus mažinimas galimas, nustačius, kad eksperimento rezultatai atsikartoja, kas ir yra numatoma padaryti. Šiuo aspektu numatyta mažinti gyvūnų skaičių, atliekant kiek galima maksimaliai procedūrų skaičių vienam gyvūniui, optimizuojant metodologinius aspektus.

Optimized plan how to minimize the number of experimental animals presented above. Reducing the number of animals available, subject to the results of the experiment repeat, who is expected to do so. To reduce the number of animals referred to in this respect, as far as possible to maximize the number of procedures per animal, optimizing the methodological aspects.