

#### Príloha č. 4

Netechnické zhrnutie projektu podľa §35 ods. 2 písm. b) a § 40 nariadenia vlády SR č. 377/2012

**Názov projektu:**

**Aktivácia neurónov sprostredkujúcich bolesť včelím jedom**

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1399-3/2020-220

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** včelí jed, melitín, neuróny

**Účel projektu\*:** Základný výskum

**Ciele projektu:**

Uštipnutie včelou je sprevádzané bolesťou a u alergikov môže vyvolať život ohrozujúci stav šoku. Viaceré štúdie potvrdzujú, že melitín (toxín, ktorý je hlavnou zložkou včelieho jedu) spôsobuje bolesť, avšak mechanizmy akými melitín alebo včelí jed môžu aktivovať neuróny, neboli doteraz na úrovni molekúl dostatočne popísané. Preto by sme v rámci predkladaného projektu chceli študovať ako dochádza k aktivácii neurónov po podaní včelieho jedu aj melitínu, pričom otestujeme úlohu receptora TRPV1, ktorý je prítomný na povrchu neurónov sprostredkujúcich bolesť a stanovíme úlohu tzv. G-proteínov.

**Prínos z vykonaného projektu:**

V rámci tohto projektu chceme prispieť k lepšiemu pochopeniu mechanizmov aktivácie nervových vlákien včelím jedom (resp.melitínom). Predpokladáme, že popísanie týchto procesov poskytne poznatky dôležité pre vývoj nových liečiv so zameraním na tlmenie bolesti.

Hypotézy, ktoré predkladáme v tomto návrhu neboli nikdy doteraz skúmané a predstavujú nový zdroj poznatkov.

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

Myš laboratórna (Mus musculus), C57BL/6J , samce, celkový počet: 126 / 2roky

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

Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a veľmi sa osvedčili v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Ide o experimenty bez možnosti zotavenia zvierat'a, usmrtenie bude vykonané humánnym spôsobom - inhaláciou CO<sub>2</sub> a následne sa vykonáva chirurgický zákrok, kedy sa prestrihne srdce a zviera vykrváca (tkanivo je tak očistené od krvi).

Experimenty sú pripravené tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

Experimenty, ktoré budú v rámci projektu vykonávané na zvieratách spadajú podľa prílohy 4 Nariadenia vlády SR č. 377/2012 Z.z.do nasledovných kategórií:

#### **bez možnosti zotavenia:**

- chirurgická príprava kože a nervových vlákien za účelom metódy extracelulárnej elektrofyziológie

### **Uplatňovanie zásad 3R**

#### **Nahradenie:**

Alternatívne metódy na štúdium aktivácie neurónov na nervových zakončeníach neexistujú. Nie je možné použiť iný laboratórny živočíšny druh, pretože práve u myši boli vytvorené jedinečné geneticky upravené kmene, ktoré sú pre náš výskum kľúčové. Prieskum databáz ukázal, že vzhľadom na množstvo rôznych podtypov neurónov nie je možné použiť modelovanie ani jednoduchšie systémy (bunkové kultúry a pod.)

#### **Redukcia:**

Počet zvierat je zredukovaný na najnižší počet, potrebný na získanie overiteľných výsledkov, ďalšie znižovanie počtu experimentov je spojené s rizikom falošne negatívnych alebo falošne pozitívnych výsledkov, ktoré by potenciálne viedli k neopodstatneným experimentom na ďalších zvieratách. Ak však priebežne v experimentoch dosiahneme relevantné výsledky, je v našom najlepšom záujme znižovať plánovaný počet zvierat.

#### **Zjemnenie:**

Metodiky elektrofyziologického štúdia neurónov sa vyvíjali a vylepšovali v období posledných 20 rokov na základe a v súlade s najnovšími poznatkami z oblasti neurofyziológie. Naš výskum sa opiera o najmodernejšie metódy štúdia nervovej aktivity, ktoré sa používajú na najprestížnejších výskumných pracoviskách na svete.

#### ***Experimenty bez možnosti zotavenia zvierat'a:***

V prípade experimentov bez možnosti zotavenia zvierat'a za účelom extracelulárnej elektrofyziológie bude usmrtenie vykonané humánnym spôsobom - inhaláciou CO<sub>2</sub> a následne sa vykonáva chirurgický zákrok, kedy sa prestrihne srdce a zviera vykrváca (tkanivo je tak očistené od krvi).

Všetky aktivity súvisiace s postupmi budeme vykonávať v súlade s platnými zákonmi a nariadeniami o starostlivosti o laboratórne zvieratá, aby sme zabezpečili humánne zaobchádzanie so zvieratami. Metodické postupy, ktoré použijeme pri realizácii projektu používame dlhodobo a osvedčili sa v rámci riešenia predchádzajúcich vedecko-výskumných úloh. Výsledky získané týmito metódami boli publikované a prezentované na odborných fórach nielen doma ale aj v zahraničí. Postupy sú pripravené

tak, aby sa maximálne vylúčil strach, zbytočná bolesť a utrpenie pokusných zvierat a aby boli zvieratá využité humánne a zodpovedne na získanie nových vedeckých poznatkov.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu:       áno       nie

## Príloha 2 Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Rozmnožovanie spevavcov pre pokusy

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1942-3/2020-220

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

**Účel projektu\*:** Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo  
zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania  
v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

### Opísať ciele projektu:

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

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

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

### Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

zebrička červenozobá (*Taeniopygia guttata*), 55 jedincov;  
pestúnka japonská (*Lonchura striata domestica*), 40 jedincov;  
odchovajú spolu 480 mláďat

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

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

## **Predpokladaná úroveň krutosti:**

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

## **Uplatňovanie zásad 3R**

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

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

Projekt rozmnožovania nemožno uskutočniť bez použitia zvierat. Daný model v nami realizovanom výskume sa nedá nahradiť.

### **2. Redukcia počtu zvierat:**

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

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

### **3. Zjemnenie:**

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

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

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie

## Netechnické zhrnutie projektu 2032-3/2020-220a

**Názov projektu:** Tréning vnútrožilovej aplikácie roztokov myšiam.

**Kľúčové slová:** Tréning

**Účel projektu:**

Základný výskum/Aplikovaný výskum/Odborné vzdelávanie

**Cieľ projektu:** Cieľom projektu je zacvičiť pracovníkov na vnútrožilové podávanie roztoku. Vnútrožilová aplikácia farmák a agensov je dôležitým spôsobom systemického dodania farmák a agensov do organizmu. Pretože myši sú veľmi drobné organizmy, úspešná aplikácia s minimálnym narušením organizmu vyžaduje tréning. **Druhým cieľom projektu je optimalizácia izolácie kardiomyocytov.**

**Prínos projektu:** Pre základný aj aplikovaný výskum v kardiológii na úrovniach od molekulárnej po celotelovú je dôležité byť schopný ovplyvňovať alebo identifikovať fyziologické procesy nielen pomocou inhibítorov alebo aktivátorov, ale aj na genetickej úrovni. Ako alternatíva k tvorbe GMO kmeňov sa veľmi nádejne javí transfekcia organizmu in vivo pomocou vírusových vektorov, najmä adenoasociovaného vírusu. Z bezpečnostných dôvodov je nevyhnutné používať replikačne deficientné rekombinantné vírusové vektory, ktoré však musia byť aplikované tak, aby mohli infikovať bunky cieľového tkaniva. Preto je primárnym typom systémová aplikácia do žily. Pre účinnú vnútrožilovú aplikáciu najmä v drobných organizmoch ako sú myši je potrebné zacvičenie pracovníkov.

**Pre zabezpečenie kvality výskumu na izolovaných myocytoch je dôležité získať čo najkvalitnejšie bunky a tým minimalizovať počet zvierat, z ktorých je potrebné bunky izolovať. Čerstvo izolované myocyty sú modelovým systémom pre výskum problematicky srdcovej funkcie a patológie, ktoré zatiaľ nie je možné nahradiť tkanivovými kultúrami.**

**Počet a druh použitých zvierat:** 18 ks myši laboratórnej kmeňa C57BL/6N

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

Zvieratám bude 3x aplikovaný fyziologický roztok v objeme 0,1 ml. Dôjde u nich ku krátkodobému malému stresu zmiernenému anestéziou, bez ďalších následkov.

Zvieratám bude aplikovaný fyziologický roztok s obsahom fluorescenčného dextránu (0,1%, 0,1 ml). Dôjde u nich ku krátkodobému malému stresu zmiernenému anestéziou, bez ďalších následkov.

**Vzhľadom na opakovanú injekčnú aplikáciu je projekt charakterizovaný ako stredne krutý.**

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

Celková krutosť projektu: **Stredná.**

**Súladi s požiadavkami „3R“****Nahradenie**

Hlodavce v tomto type experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov.

**Obmedzenie:**

Projekt bol optimalizovaný z hľadiska minimalizácie počtu použitých zvierat.

**Zjemnenie:**

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzenú sociálnu interakciu. Zvieratám bude zabezpečený stály prísun vody a potravy. Kliecky budú obsahovať prvky obohatenia (hniezdny materiál, hniezdne búdky). Na práci so zvieratami sa budú podieľať len pracovníci vyškolení na prácu so zvieratami, ktorí sa budú pravidelne venovať handlingu pokusných zvierat. Pri aplikácii injekcií budú zvieratá fixované na mäkkej podložke a použité budú inzulínové ihly s veľmi malým priemerom, vpichovaný objem bude maximálne 100 µl. **V prípade potreby bude zvieratám na chvost aplikovaná lokálna anestézia.** Zdravotný stav zvierat bude pravidelne monitorovaný. Zvieratá trpiace neprimeranou bolesťou budú ihneď humánne usmrtené.

**Spätné posúdenie projektu:**

**Ano/nie**, tento typ projektu nevyžaduje spätné posúdenie.

## Netechnické zhrnutie projektu 2032 - 3/2020 - 2206

**Názov projektu:** AAV9 – zistenie vhodnej dávky a spôsobu aplikácie

**Kľúčové slová:** *In vivo* transfekcia, optimalizácia postupov, AAV, AAV9

**Účel projektu:**

Základný výskum/Aplikovaný výskum

**Cieľ projektu:** Stanovenie vhodnej dávky a vhodného spôsobu aplikácie replikačne deficientného vírusového vektora pre *in vivo* transfekciu kardiomyocytov.

**Prínos projektu:** Optimalizácia metód základného a aplikovaného výskumu. Transfekcia buniek cieľového tkaniva *in vivo* je metódou umožňujúcou tvorbu limitovaného množstva cielene vytvorených animálnych modelov redukujúcou počet použitých experimentálnych zvierat a umožňuje cieleňú, lokalizovanú expresiu prispievajúcu k zjemneniu experimentálnych postupov.

**Počet a druh použitých zvierat:** 12 ks myši laboratórnej oboch pohlaví kmeňa C57BL/6N

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

Zvieratám použitým na stanovenie vhodnej dávky a spôsobu aplikácie adenoasociovaného vírusu pre získanie transfekcie časti kardiomyocytov pri minimalizovaní negatívneho účinku bude spôsobený krátky a mierny stres počas aplikácie vírusu, v prípade vnútrožilnej aplikácie zmiernený anestéziou. Infekcia vírusom u zvierat môže spôsobiť zápalový proces a expresia vneseného génu môže mať negatívny vplyv na funkciu srdca. Adenoasociovaný vírus sa používa na vyvolanie expresie vneseného génu (v našom prípade fluorescenčného proteínu) v cieľovom tkanive myši bez nutnosti vytvárať GMO líniu myši.

**Predpokladaná úroveň krutosti:**

Celková krutosť projektu: **Stredná**.

**Súlad s požiadavkami „3R“**

**Nahradenie**

Hlodavce v tomto type experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov.

**Obmedzenie:**

Projekt bol optimalizovaný z hľadiska minimalizácie počtu použitých zvierat. Pri testovaní vhodnej dávky a spôsobu aplikácie AAV9 vírusu budeme vykonávať pokusy v menších sériách tak, aby sme vytvorili len skupiny relevantné pre biomedicínsky výskum, teda len také, u ktorých dôjde k signifikantnej transfekcii buniek bez negatívneho vplyvu na funkciu srdca a celkový zdravotný stav.

**Zjemnenie:**

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzenú sociálnu interakciu. Zvieratám bude zabezpečený stály prísun vody a potravy. Kliečky budú obsahovať prvky obohatenia (hniezdny materiál,



hniezdne bunky). Na práci so zvieratami sa budú podieľať len pracovníci vyškolení na prácu so zvieratami, ktorí sa budú pravidelne venovať handlingu pokusných zvierat. Pri aplikácii injekcií budú zvieratá fixované na mäkkej podložke a použité budú inzulínové ihly s veľmi malým priemerom, vpichovaný objem bude maximálne 100 µl na vpich.

Počas celej doby trvania projektu bude sledovaný zdravotný stav a komfort zvierat, nebude im spôsobená zbytočná bolesť, strach ani utrpenie. Každé zviera bude denne hodnotené na základe nasledujúcich kritérií (EF = ejekčná frakcia zistená pomocou echokardiografie, bodovo hodnotená bude vždy posledná nameraná hodnota):

| Skóre            | 1                                 | 2                                | 3                 |
|------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Fyzický vzhľad   | Neprítomnosť čistenia<br>Letargia | Zhrbený postoj<br>Naježená srst' | Abnormálny postoj |
| Telesná hmotnosť | Pokles do 10%                     | Pokles o 10 - 20%*               | Pokles nad 20%    |
| Patológia srdca  | EF 30 - 35%                       | EF 20 - 30%                      | EF 20% a menej    |

\*Pri poklese hmotnosti nad 10% pomoc pri kŕmení - zvýšená podstielka, potrava a hydrogél v kletke.

Zviera, ktoré dosiahne súčet skóre 4 a viac, alebo v ktoromkoľvek kritériu hodnotenie 3, bude humánne usmrtené.

**Spätné posúdenie projektu:**

Áno/nie, do troch mesiacov od ukončenia projektu.

## Netechnické zhrnutie projektu

2032-3/2020-220

**Názov projektu:**

Vplyv utlmenia expresie jednotlivých typov NCX na fyziológiu a patofyziológiu solidných nádorov a objasnenie možného prepojenia s endogénnou produkciou H<sub>2</sub>S a vápnikovou signalizáciou.

**Kľúčové slová:**

enzým cystationín-β-syntáza (CBS), merkaptopyruvát-sulfurtransferáza (MPST), sodíkovo-vápnikový výmenník typu 1 a typu 3, tumorigenéza

**Účel projektu:**

Základný výskum

**Cieľ projektu:**

Vzhľadom na problematiku nedostatočnej odpovedi niektorých typov nádorov na protinádorovú liečbu, je hľadanie nových liečebných procesov nevyhnutnosťou. Cieľom plánovaného projektu je vyhodnotiť, aký vplyv majú zmeny v expresii CBS, MPST, NCX1 a NCX3 na fyziológiu a patofyziológiu solidných nádorov.

**Prínos projektu:**

Potvrdenie vplyvu funkčnej delécie enzýmov cystationín-β-syntáza - CBS alebo merkaptopyruvát-sulfurtransferáza - MPST alebo sodíkovo-vápnikových výmenníkov typu 1 - NCX1 alebo sodíkovo-vápnikových výmenníkov typu 3 – NCX3 na inhibíciu rastu nádorov.

**Počet a druh použitých zvierat:**

504 ks myši kmeňa SCID/bg

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

Použité zvieratá neutrpia ujmu okrem krátkodobého mierneho stresu spôsobeného zákrokmi, ako sú: subkutánne podanie nádorových buniek, intraperitonálne podávanie liečiva, meranie rastu nádorov, humánne usmrtenie zvierat. Subkutánne xenografty do 1cm<sup>3</sup> nespôsobujú bolesť ani diskomfort. Zdravotný stav zvierat sa bude denne kontrolovať.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** celková úroveň krutosti postupov v projekte je **stredná**.

**Súlad s požiadavkami „3R“****Nahradenie:**

Myši v tomto štádiu experimentov nie je možné nahradiť bunkovými kultúrami, ani nižším druhom živočíchov. Experimentom na zvieratách predchádzali štúdie v *in vitro* podmienkach, v ktorých bunkové línie s funkčnou deléciou enzýmov cystationín-β-syntáza - CBS alebo merkaptopyruvát-sulfurtransferáza - MPST alebo s funkčnou deléciou sodíkovo-vápnikových výmenníkov typu 1 - NCX1 (SLC8A1) alebo sodíkovo-vápnikových výmenníkov typu 3 – NCX3 (SLC8A3) vykazovali signifikantný efekt na apoptózu v porovnaní s parentálnymi nádorovými bunkami toho istého typu bez funkčnej delécie týchto proteínov. Tento výsledok je však nutné overiť na *in vivo* modeli.

**Obmedzenie:**

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

**Zjemnenie:**

Zvieratá budú držané v skupinách umožňujúcich prirodzené sociálne správanie so stálym prísunom potravy a pitnej vody. Máme vypracované postupy, ktoré minimalizujú traumatizáciu zvierat počas injekčných aplikácií. Na projekte sa budú podieľať len skúsení pracovníci vyškolení na prácu s laboratórnymi zvieratami.

Zdravotný stav zvierat sa bude denne kontrolovať. Zvieratá s vážne zhoršeným zdravotným stavom budú eutanazované. Zhoršenie zdravotného stavu sa prejaví viacerými nasledujúcimi znakmi: strata hmotnosti rovnej ale vyššej ako 10 %, pri fyzických prejavoch (napr. naježená srst', zhrbený postoj), pri pozorovaní faciálnej expresie bolesti (orbitálne zúženie očí, zmenené držanie ušnic a fúzikov, vyčnievajúce líčne výbežky; Na základe našich skúseností sa vyskytujú vždy viaceré znaky súčasne (postavenie fúzov spolu so zúžením očí, ..). Na uplatnenie humánneho ukončenia postupu bude postačovať, ak jeden zo znakov dosiahne hranicu „severe“, závažný podľa publikácie (DJ Langford et al., 2010: Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse, NATURE METHODS, VOL.7 NO. 6 JUNE 2010; doi:10.1038/nmeth.1455) pristúpime k humánnemu ukončeniu postupu. V prípade nečakaného a závažného zhoršenia zdravotného stavu chovaného zvieratá alebo ak xenografty dosiahnu veľkosť 1 cm<sup>3</sup> ešte pred plánovaným ukončením projektu, kedy by bolo nehumánne držať zviera do konca postupu sa pristúpi k eutanázii cervikálnou dislokáciou alebo podaním letálnej dávky Thiopentalu s následným kardiálnym preplachom fyziologickým roztokom potrebným pre následné spracovanie tkanív. Ak nádor ulceruje, ak ovplyvňuje normálne správanie, držanie tela alebo pohyb, alebo ak sa jeho priemer zväčší na viac než 1 cm<sup>3</sup>, zvieratá sa humánne usmrtia ešte pred plánovaným ukončením postupu (Workman a kol., 2010).

**Spätné posúdenie projektu:**

Projekt nevyžaduje spätné posúdenie.