

Príloha č.2

14. Netechnické zhrnutie projektu - 2953-3/2020-220

Názov projektu: Chronobiologické aspekty pohlavných rozdielov po apnoickej epizóde centrálneho typu a reoxygénácie v experimentálnom modeli potkana v celkovej anestézii.

Kľúčové slová v projekte:

Chronobiológia, apnoická epizóda, anestézia, pohlavie, kardiovaskulárny systém, autonómny nervový systém, potkan

Účel projektu: základný výskum

Predovšetkým ide o metodologickú štúdiu, kde hlavným vedeckým cieľom projektu je posúdenie chronobiológie pohlavných rozdielov v zoletilovej anestézii na kardiovaskulárny systém, aktivitu autonómneho nervového systému a acidobázickú rovnováhu po apnoickej epizóde a obnove pľúcnej ventilácie (reoxygénácie) v modeli potkana. Čiastkové vedecké ciele navrhovaného projektu:

- vytvorenie komplexného chronobiologického experimentálneho modelu poukazujúceho na pohlavné rozdiely v srdcovej frekvencii, elektrofyziologických EKG parametroch, v tonuse autonómneho nervového systému, meraného metódou variability srdcovej frekvencie v podmienkach spontánneho dýchania v zoletilovej anestézii.
- konštituovanie metodologického pohľadu na svetlo-tma rozdiely a pohlavné rozdiely vo vyššie spomenutých parametroch v experimentálnych modeloch v zoletilovej anestézii po chirurgickom zákroku (tracheotómia) a posúdenie efektu umelej pľúcnej ventilácie (5 minút umelej ventilácie pri parametroch ventilácie 50 dychov/min, dychový objem 1 ml/100 g telesnej hmotnosti).
- vytvorenie chronobiologického experimentálneho modelu poukazujúceho na pohlavné rozdiely dopadu ventilačnej apnoickej epizódy centrálneho typu (simulácia vypnutím ventilátora) a obnovy pľúcnej ventilácie (reoxygénácie) na vyššie spomínané parametre v zoletilovej anestézii.

Predpokladaný prínos

Rozšírenie a detailnejšie pochopenie dopadu apnoickej epizódy a následnej reoxygénácie na reaktivitu srdca a kontrolné autonómne mechanizmy u oboch pohlaví z chronobiologického aspektu. Dotýka sa to oblasti spánkových porúch dýchania, ako napríklad pri syndróme spánkového apnoe. Spojenie ochorení kardiovaskulárneho systému s obštrukčným typom spánkového apnoe je široko popísané v literatúre, no menej je známe o efekte centrálneho spánkového apnoe na poruchy srdcového rytmu, čo rieši aj náš model.

Využitie poznatkov z nášho experimentálneho modelu je možné v aplikovanom, respektíve aj v klinickom výskume osôb, trpiacich na spomínaný syndróm. Pomerne aj veľa mužov, ale aj žien, pracuje v smenových prevádzkach, alebo napríklad aj pri prechodoch cez viaceré časové zóny. To sú situácie, kedy sa ich vnútorné rytmy desynchronizujú s rytmicitami vonkajšieho prostredia pričom takáto desynchronizácia môže meniť náchylnosť myokardu na rôzne poruchy srdcového rytmu aj vo vzťahu k apnoickým epizódam a obnove pľúcnej ventilácie. Elektrofyziologické predispozície k arytmiám, tonus autonómneho nervového systému sú jednoznačne menené apnoickou epizódou. Otvorenou otázkou zostáva, ako sa budú meniť v závislosti na pohlaví a periodicite vonkajšieho prostredia, v našom modeli na cykle striedania sa svetla a tmy. Znamená to, že vulnerabilita srdca ku komorovým arytmiám v spojení s apnoickou epizódou a v interakciách s faktormi, ktoré spúšťajú poruchy srdcového rytmu (autonómny nervový systém) môže byť odlišná v rôznych časoch dňa.

Druhy použitých zvierat a ich počty: 80 pohlavne zrelých potkanov kmeňa Wistar, konvečný chov, z toho 40 samíc a 40 samcov

Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonania projektu: Ide o jednorázové experimenty, kde nie je možnosť zotavenia, nakoľko prebehne tracheotómia a umelo ovplyvňovaná pľúcna ventilácia. Experimenty budú prevádzané v celkovej anestéze a zvieratá budú usmrtené aplikáciou nadmerek dávky anestetika.

Režim striedania sa svetla a tmy je jeden z najväčších synchronizátorov endogénnych rytmov. Nepriaznivý efekt takéhoto režimu nemá vplyv na zdravotný stav zvierat, aspoň o tom neexistuje žiaden literárny doklad. Nakoľko experimenty budú robené počas pracovnej doby, zmena svetelného režimu nám umožní otestovať aj efekt tmy, nielen svetla. V inom prípade by sa museli experimenty robiť počas 24 hodín, ak sa má hodnotiť efekt svetla a tmy na sledované parametre. Celý časový postup experimentu je úplne rovnaký u všetkých zvierat, len s tým rozdielom, že skupina 1 a 2 bude robená po adaptácii zvierat na režim svetla a tmy, kde svetlo bude od 06:00 do 18:00 hodiny (simulácia svetlej periódy) a skupina 3 a 4 bude robená po adaptácii zvierat na režim svetla a tmy, kde svetlo bude od 18:00 do 06:00 hodiny (simulácia tmavej periódy). Týmto spôsobom sa môže testovať efekt neaktívnej (svetlo) a aktívnej (tma) periódy ich režimového dňa.

Zvieratá budú držané v absolútne tých istých chovných podmienkach a to pri oboch svetelných režimoch.

Zvieratá nebudú individuálne označované, budú vedené len záznamové karty o zvierati (príjem na oddelenie, veterinárna starostlivosť, karanténna, podmienky ustajnenia, adaptácia, čas experimentu, exitus a podobne). Individuálne označenie pri tomto type experimentu nie je potrebné, nakoľko to isté zviera nebude neskoršie prechádzať inými experimentálnymi procedúrami. Sú to jednorázové experimenty končiace sa exitom zvieratá.

Predpokladaná úroveň krutosti: Postupy v experimente sú v kategórii krutosti určené ako slabé.

Zvieratá budú pociťovať iba krátkodobú slabú bolesť a to pri aplikácii anestetika a nebudú pociťovať prakticky žiadne utrpenie a strach.

manipulácia so zvieratami – slabá

adaptácia zvierat na svetlo-tma režim - slabá

aplikácia Zoletilu – slabá

usmrtenie – slabá

Popis použitých metodologických postupov a ich zdôvodnenie

Anestézia – zoletilová anestézia v predpísanej dávke. Ľahká aplikovateľnosť – intraperitoneálne nakoľko sa anestézia podáva aj v tmavej časti režimového dňa. Celkový anestetický efekt cca 45 minút bez ďalšieho bolusu anestetika.

Tracheotómia – nutná pre kontrolovateľnú ventiláciu pľúc (nastaviteľný dychový objem a frekvencia dýchania)

2 minútové ventilačné apnoe centrálného typu – vyvolané vypnutím dýchacej pumpy, nakoľko 90 až 120 sekúnd apnoickej epizódy (vypnutie ventilačnej pumpy) vyvolávajú pomerne výrazné zmeny v EKG a nevyvolávajú poruchy srdcového rytmu. Trvanie apnoe nad 120 sekúnd vyvoláva spontánne poruchy srdcového rytmu (najčastejšie bigemiu s následnými blokmi AV vedenia).

5 minútové ventilačné apnoe obštrukčného typu – vyvolané znížením ventilácie o polovicu dychovej frekvencie a dychového objemu. Trvanie hypoventilácie nad 5 minút vyvoláva spontánne poruchy srdcového rytmu (najčastešie bigemiu s následnými blokmi AV vedenia)

20 minútová reoxygénácia – dostačujúca pre posúdenie zmien v elektrickej stabilite srdca a v ďalších hodnotených parametroch. Dlhšie trvajúca reoxygénácia v podstate neovplyvňuje sledované parametre.

Softwarové snímanie a hodnotenie EKG a frekvencie srdca - počítačový systém ID Instrument na snímanie a hodnotenie biosignálov

Softwarové snímanie a hodnotenie variability frekvencie akcie srdca – počítačový systém ID Instrument na snímanie a hodnotenie biosignálov

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: nie

Aktualizované netechnické zhrnutie projektu po spätnom posúdení

Názov projektu: Úloha vitamínu D a ďalších markerov vo vzťahu k priebehu sclerosis multiplex

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro-3352/16-221

Kľúčové slová: demyelination, encephalomyelitis

Účel projektu: základný výskum

Cieľ projektu:

Cieľom projektu bolo po indukcii a optimalizácii modelu experimentálnej alergickej encefalomyelitídy u C57BL/6NCrI myši vyhodnotiť vplyv derivátov vitamínu D na frekvenciu a závažnosť výskytu rôznych štádií vývoja patológie EAE (relaps, remisia) a na progresiu neurologického zneschopenia zvierat.

Prínos z vykonaného projektu:

Preventívne vitamínu D významne ovplyvnilo neurologické skóre priebehu EAE a proteomický profil plazmy. Zvieratá s EAE a premedikáciou s vit D vykazovali miernejšie motorické príznaky neurologického poškodenia vplyvom vyvolaného EAE, napr. ako je paraplégia zadných končatín, ochabnutie chvosta, slabosť až paralýza zadných končatín. Zvieratá boli oveľa životaschopnejšie po podaní vit D v porovnaní s s EAE zvieratami bez podania vit D.

Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:

Po s.c. aplikácii MOG peptidu sa objavili podkožné zdureniny, ktoré sa postupne vstreballi. Zvieratá si rýchlo zvykli na testy, pri ktorých sa hodnotilo EAE skóre. Zákroky smerujúce k vyvolaniu EAE výrazne neovplyvnili zvieratá. Po vzniku príznakov EAE dochádzalo k zhoršeniu zdravotného stavu, postihnuté zvieratá prejavovali známky neurologického poškodenia – predovšetkým poruchy chôdze, slabosť zadných končatín až ich paralýzu, zhoršenú koordináciu a stratu tonusu chvosta. Niektoré zvieratá boli v dôsledku zhoršeného zdravotného stavu usmrtené.

Počet a druh použitých zvierat:

V projekte bolo použitých 85 dospelých samíc myši kmeňa C57BL/6NCrI

Klasifikácia krutosti postupov:

Plánované postupy vykonané na zvieratách boli zaradené do kategórie – krutý. Ide o zvierací model ľudského ochorenia sclerosis multiplex, pri ktorom je pravdepodobné, že tento postup vážne naruší pohodu alebo celkový stav zvierat.

Zárok	Krutosť	
Váženie zvierat	slabá	85
s.c. aplikácia MOG peptidu	slabá	61
i.p. aplikácia pertussis toxín	stredná	61
opakované podávanie fyziol.roztoku a vit.D	stredná	34
opakované vyhodnocovanie EAE	stredná	26
prežívanie zvierat po vyvolaní EAE	krutá	61/5 utratené

Uplatňovanie zásad 3R:

Nahradenie zvierat (Replacement):

Na sledovanie vplyvu vitamínu D na poškodenie centrálného nervového systému v dôsledku autoimunitnej demyelinizácie a zápalu počas experimentálnej autoimunitnej encefalomyelitídy neexistuje alternatívna metóda, ktorá by buď na izolovaných bunkových líniiach, tkanivových kultúrach, či postupoch *in vitro* dokonale modelovala súbor procesov a mechanizmov súvisiacich s autoimunitným zápalovým poškodením centrálného nervového systému bez využitia celostného prístupu, t.j. na experimentálnych zvieratách. Dôvodom je vysoká komplexnosť procesov, kooperácia rôznych typov buniek a systémov, ako aj celková odpoveď organizmu na poškodzujúci podnet.

Zníženie počtu zvierat (Reduction):

Plánované experimenty boli navrhnuté tak, aby bol použitý čo najmenší počet zvierat, aby sme zabezpečili validitu a reprodukovateľnosť výsledkov. Menší počet zvierat by mohol ovplyvniť objektívne zhodnotenie výsledkov celého projektu.

Zjemnenie (Refinement):

Zákroky smerujúce k ovplyvneniu a vyvolaniu EAE, t.j. subkutánne a intraperitoneálne podávanie látok, zvieratá boli pre zvieratá krátkodobo mierne bolestivé. Vyvolanie chronickej relapsujúcej EAE narušilo pohodu resp. celkový stav zvierat. Akútne príznaky demyelinizácie postupne v priebehu jedného mesiaca odzneli a zvieratá sa zotavili. Naše predchádzajúce skúsenosti s modelom EAE u C57BL/6NCrl myší hovoria, že aj zvieratá, u ktorých vzniká najčastejší motorický príznak EAE, ktorým je paraplégia zadných končatín, sú veľmi životaschopné a presúvajú sa k zdroju potravy pomocou predných končatín. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach. V klietkach boli umiestnené v malých skupinách po 3-4 kusy. Klietky všetkých zvierat boli obohatené o iglu domčeky, ktoré zabezpečili zvieratám úkryt a o drevené hranolčeky na hryzenie a hranie. **Utratených bolo 5 zvierat.**

Spätné posúdenie projektu: projekt vyžadoval spätné posúdenie

Netechnické zhrnutia projektu *-aktualizácia*

Názov projektu: Aplikácia kombinovanej terapie na potlačenie sekundárneho poškodenia miechy po traume

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Ro 4434/16-221/3

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): kompresia miechy, zápal, inhibičné molekuly, rastové faktory, elektrostimulácia.

Účel projektu*:

Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

Cieľom predloženého projektu bolo redukovať sekundárne poškodenie v mieche po traume. Zvýšené uvoľňovanie dvoch skupín rastových inhibítorov – inhibítorov spojených s myelínom (MAIs) a inhibítorov spojených s extracelulárnou matrix (ECM) v okolí lézie výrazne limituje funkčnú obnovu a anatomické znovu-usporiadanie štruktúr v experimentálnych modeloch poškodenia miechy. Cieľom projektu bolo podporiť regeneráciu axónov a zlepšiť funkčný stav po traume miechy 1) blokovaním signálnych dráh pre tieto rastové inhibítory, 2) aplikáciou protizápalového liečiva Atorvastatínu, 3) aplikáciou dlhodobej elektrostimulácie, a 4) dlhodobým vytrvalostným tréningom, ktorý stimuluje tvorbu rastových faktorov. Vytrvalostný tréning (beh) spôsobuje pretrvávajúci nárast hladiny BDNF v krvnom obeh. Keďže BDNF prechádza cez hematoencefalickú bariéru v oboch smeroch, jeho zvýšená hladina v krvi môže predstavovať potenciálny rezervoár pre potreby mozgu za kľudových podmienok. Naše predchádzajúce výsledky ukázali, že 6-týždňový trvajúci vytrvalostný tréning má dva dni po ukončení posledného cvičenia za následok signifikantné zvýšenie hladiny BDNF a TrkB mRNA v striate, strednom mozgu a hipokampe (o 58%, 89% a 62%) (62). Navyše, fyzický tréning (dobrovoľné, aktívne krokové cvičenie v kombinácii s pasívnymi pohybmi predných a zadných končatín) účinne zvyšuje posttraumatickú úroveň BDNF, NT-3 a NT-4, čím podporuje vhodné prostredie pre rast axónov. Predpokladali sme, že 6-týždňový vytrvalostný tréning (beh) pred samotným poškodením miechy zvýši úroveň neurotrofických faktorov a ich receptorov v motoneurónoch miechy, ovplyvní regeneračnú kapacitu neurónov a v konečnom dôsledku aj samotnú kompenzačnú schopnosť miechy voči poškodeniu.

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

Naša pracovná hypotéza bola založená na poznatkoch, že vývin lokálneho edému a výsledná sekundárna ischémia v epicentre poškodenia miechy vedie k narastajúcej degenerácii axónov a k strate funkcie zadných končatín. Naše výsledky majú pre neuroregeneračný výskum prínos z viacerých hľadísk. Blokovanie inhibičných molekúl počas prvých dvoch týždňov po

traume miechy podstatne ochránilo integritu tkaniva v mieste lézie a jej okolí a zvýšilo expresiu prerastajúcich vlákien. Atorvastatin, aplikovaný ihneď po traume výrazne potlačil markery zápalovej odpovede a znížil apoptózu buniek, a po dlhodobom prežívaní podporil expresiu génov, ktoré zohrávajú úlohu v neuroregenerácii a funkčnej obnove. Po vytrvalostnom tréningu sme identifikovali signálne dráhy, ktoré sa aktivujú a sú kľúčové pre stimuláciu rastových faktorov. Elektrostimulácia je neinvazívny prístup, ktorý inhiboval astrogliózu, redukoval poškodenie bielej hmoty v zadných povrazcoch a zvýšil prerastanie GAP-43 imunoreaktívnych axónov a neurofilamentov. V porovnaní s neliečenými zvieratami sme po aplikácii terapeutických prístupov zaznamenali významné zlepšenie neurologických funkcií. Potlačenie zápalovej reakcie, potlačenie inhibítorov spojených s myelínovými fragmentmi a tvorbou gliovej jazvy, elektrostimulácia, ako aj vytrvalostný tréning by mohli mimoriadne pomôcť pri vypracovaní optimálnej kombinovanej stratégie na reparáciu traumou poranenej miechy. Ak sa podarí udržať regeneračný potenciál zreých neurónov a úspešnú regeneráciu axónov aj po skončení liečby, malo by to znamenať klinicky relevantné zlepšenie neurologických funkcií.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V experimentoch boli použité laboratórne potkany (*Rattus norvegicus*) kmeňa Wistar, samice v počte 480 ks na celú dobu riešenia (02/2017-06/2020), pričom celkový počet schválených experimentálnych zvierat bol 525.

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

Kompresia miechy bola uskutočnená z jej dorzálnej strany, ale tlak na miechu vyvolal poškodenie, ktoré sa rozšírilo aj do okolia. Tým sa porušili základné motorické reflexy, ktoré zabezpečujú stálu adaptáciu dĺžky svalu na pohyb, ďalej polysynaptické reflexy, ktoré ukončujú kontrakcie vyvolané napínavým reflexom a exteroceptívne reflexy, ktoré vznikajú dráždením receptorov uložených predovšetkým v koži. Tieto reflexy boli po traumatickom poškodení miechy zachované iba čiastočne.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Na základe posudzovaných faktorov bola u 363 zvierat navrhnutá klasifikácia krutosti postupu ako „krutá“. Klasifikácia krutosti pre zvyšných 117 zvierat bola stanovená ako „stredná krutosť“. Ide o nižšie uvedené experimentálne skupiny: kontrolné zvieratá, ktoré boli použité pri každom zákroku (liečba atorvastatínom, liečba s inhibítorom Y-27632, aplikácia chitozanu na premostenie kavity, podpora prerastania vlákien pomocou elektrostimulátora, endogénna stimulácia rastových faktorov vytrvalostným tréningom zvierat) na molekulárno-biochemické analýzy (60 zvierat) alebo imunohistochemické analýzy (57 zvierat).

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Existujúce alternatívne metódy nemôžu poskytnúť komplexnú odpoveď, pretože sa jedná o finálne testovanie fyziologických a patofyziologických účinkov. Počet zvierat použitých v kontrolnej a experimentálnej skupine je obmedzený na možné minimum. Zvieratá boli uspaté Isofluranom, po zásahu sa im podávali analgetikum (Novalgín). Odber na biochemické analýzy bol uskutočnený v hlbokéj thiopentálovej anestéze. Na histochemické analýzy bol odober torakálnej miechy uskutočnený výlučne po eutanázii zvierat'a.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

V žiadosti o schválenie projektu sme pri plánovaní počtu zvierat zvažovali nad dvoma základnými parametrami. Brali sme do úvahy možnú úmrtnosť, ktorá sa nedá presne predvídať, ale aj možnú variabilitu výsledkov. V projekte boli navrhnuté aj nové metodiky, ktoré sme doposiaľ v experimentoch nepoužívali a bolo potrebné ich najprv vyskúšať. Z toho dôvodu bolo v každej experimentálnej skupine plánovaných 5-10 zvierat. Tento počet je podľa našich doterajších skúseností najnižší vhodný počet pre získanie štatisticky významných výsledkov. Nakoľko traumou poranená miecha nemôže byť použitá zároveň na biochemické ako aj na histologické a imunohistochemické analýzy, na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie poškodenia miechy a určenie protektívneho vplyvu bolo nevyhnutné navrhnuť vyšší počet zvierat. Počas riešenia projektu bola validita nových metód úspešná a variabilita výsledkov nebola výrazná. Z toho dôvodu nebolo potrebné použiť v našich experimentoch navrhovaný počet zvierat. Celkový počet zvierat sa zredukoval na 480 ks.

V r. 2018 bol zaznamenaný väčší úhyn zvierat ako obvykle (predpokladali sme, že to nie je spôsobené iba našimi zásahmi). V máji 2018 boli uskutočnené patologické a bakteriologické vyšetrenia. U zvierat bola zistená hyperémia pečene, katarálna enteritída, a tiež boli u nich potvrdené *Escherichia coli*. Zvieratá boli preliečené, skúšobne použité v experimentoch, a keď u nich nebol pozorovaný úhyn boli použité v následných experimentoch.

3. Zjemnenie:

Všetky zákroky, ktoré boli uskutočnené na zvieratách, boli vykonávané pod celkovou anestézou, t.j. neboli pre zvieratá bolestivé.

(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)

Experimentálne zvieratá boli počas zákroku v celkovej anestéze, po zákroku im boli podávané analgetiká a antibiotiká, aby sa predišlo prípadnej bolesti a zápalovej reakcii. Každodenná starostlivosť o experimentálne zvieratá bola zabezpečená vysokoškolsky vzdelanými členmi projektu, ktorí majú prax s experimentami na zvieratách. Riešiteľský tím bol preškolený Inštitútom vzdelávania veterinárnych lekárov v rámci školenia „Ochrana zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely“. Experimentálne zvieratá boli po zásahu označené na chvoste a následne boli umiestnené individuálne v klietkach s uvedením čísla zvierat'a.

Nakoľko nepracujeme s infekčnými ani toxickým materiálmi, zvieratá boli štandardne umiestnené v pooperačnom oddelení zvieratníka.

Projekt podlieha opätovnému schvaľovaniu: áno nie

Netechnické zhrnutie projektu *- aktualizované*

Názov projektu: Metódy predikcie degradovateľnosti a stráviteľnosti dusíkatých látok krmív pre prežúvavce

Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu: Č. k. Ro 2738/16-221

Kľúčové slová v projekte (max 5 slov): bachorová kanyla, intestinálna kanyla, bachorová degradovateľnosť, črevná stráviteľnosť živín

Účel projektu*: Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

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

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

Opísať ciele projektu:

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

Predkladaný návrh projektu je vysoko aktuálny vzhľadom na potrebu znížiť náklady na chov hovädzieho dobytku (najmä dojníc) a zvýšiť ochranu životného prostredia (keďže dojnica ročne vylúči okolo 130 kg N). Podstata riešenia tohto problému je v precíznom, vybilancovanom kŕmení prežúvavcov. K tomu prispievajú čo najobjektívnejšie informácie o obsahu živín a ich kvalite v krmivách, t.j. o skutočnej nutričnej hodnote krmív. Výskumným pracoviskám je daná úloha vyvinúť rýchle a praktické metódy pre stanovenie charakteristík degradácie, ktoré umožnia na základe matematických modelov predikovať potreby živín a modelovať kŕmne dávky.

Predikčné empirické rovnice k formulovaniu kŕmnych dávok pre optimálnu produkciu sú vypracované v kontrolovaných podmienkach výskumných pracovísk (Fox et al., 2004). Pri celosvetovom raste cien krmív sa zvyšujú vstupy do chovu dojníc, preto je dôležité, aby boli kŕmne dávky zostavené na takej úrovni, ktorá dostatočne zabezpečí potreby organizmu v jednotlivých fyziologických štádiách s minimálnym negatívnym dopadom na životné prostredie. Nie je žiaduce, aby zvýšený obsah živín v kŕmnych dávkach zvyšoval ich vylučovanie a nepriaznivo ovplyvňoval vodné zdroje a ovzdušie. Správne nastavenie parametrov pre výpočet kŕmnych dávok zabezpečí vysokú utilizáciu živín (Chase et al., 2009; Tylutki et al., 2008).

Dojnice majú vysoké nároky na príjem energie a N - látok, resp. jednotlivých aminokyselín, ktoré využijú na produkciu mlieka a zabezpečenie svojich telesných potrieb s prihliadnutím na potreby bachorovej mikrobiológie - zabezpečenie optimálneho zloženia bachorovej mikrobiológie, jej optimálnej

funkcie a optimálneho mikrobiálneho rastu (Wallace et al., 1996; Ouellet et al., 2004; Marini et al., 2008).

Weendenský systém, ktorý analyzoval hrubý obsah základných živín spolu so systémom celkovo stráviteľných živín umožňoval viac ako jedno storočie vypočítať energiu a N - látky využiteľné z krmív (Morrison, 1958, cit. Sniffen et al., 1992). V osemdesiatych rokoch boli vyvinuté systémy pre hodnotenie energie pre potreby prežúvavcov (Schiemann et al., 1971; NRC 1978; van Es 1978; a iní). Pre svoju nepresnosť v predikovaní potrieb živín a ich skutočného krytia pre konkrétne produkčné skupiny zvierat sa pokračovalo vo vývoji nových systémov aj pre posudzovanie kvality dusíkatých látok. Existujúce systémy hodnotiace N -látky pre prežúvavce (PDI - Vérité et al., 1989; DCE/OEB-system - Tamminga et al., 1994; NRC 2001; AAT/PBV - Madsen et al., 1995; a iné) umožňujú predikovať nutričnú hodnotu N- látok krmív a navrhnúť požiadavky zvierat na N- látky degradované v bachore (RDP) a intestinálne strávené a absorbované bielkoviny. Tieto modely predikujú nielen úžitkovosť zvierat, ale aj exkréciu živín (Fox et al., 2004).

Nutričná hodnota N- látok v krmivách pre prežúvavce je charakterizovaná rýchlosťou degradácie a rozsahom degradácie v bachore a črevnou stráviteľnosťou v bachore nedegradovaných bielkovín (RUP). Pre charakterizáciu N- látok krmiva je nevyhnutné získať presné a správne hodnoty RDP a RUP a črevnej stráviteľnosti RUP. Súčasný modely hodnotenia krmív sú založené na frakcionácii N- látok. V európskych systémoch hodnotenia krmív (PDI - Vérité et al., 1989; DCE/OEB-system - Tamminga et al., 1994; AAT/PBV - Madsen et al., 1995; a iné) i americkom NRC (2001) sa viac ako 30 rokov používa technika *in situ* (alebo *in sacco*) podľa Ørskova a McDonalda (1979) .

Presne stanovené koeficienty intestinálnej stráviteľnosti (IS) v bachore nedegradovaných bielkovín krmiva sú základnou podmienkou správneho bilancovania krmívnych dávok. Dôležité je získať čo najviac údajov pre túto charakteristiku za štandardných podmienok vzhľadom k tomu, že existujú rozdiely v stráviteľnosti RUP medzi krmivami (Schwab et al., 2003).

V súčasnosti existuje niekoľko rôznych metód *in vitro*, a bola posudzovaná ich vhodnosť na presnú predikciu v bachore degradovaných N- látok (Schwab et al., 2003). Metódy *in vitro* boli kategorizované na metódy využívajúce bachorovú šťavu a v nej prítomnú mikroflóru, ktorá v anaeróbných podmienkach degraduje bielkoviny krmiva na nižšie frakcie N - peptidy, aminokyseliny až na amoniak (Broderick, 1987; Broderick et al., 2004; a i.). Ďalej na metódy *in vitro* nezávislé od bachorovej šťavy, ktoré zahŕňajú inkubáciu s bezbunečnými proteolytickými enzýmami získanými extrakciou zo zmesi bachorových mikróbov alebo komerčnými proteázami (Aurére et al., 1982). *In vitro* chemické metódy založené na frakcionácii N- látok krmív spočívajú na rozpustnosti N- látok v pufrí a v neutrálne a kyslo detergentných roztokoch (Sniffen et al., 1992; Licitra et al., 1996). Táto *in vitro* technika nevyžaduje fistulované zvieratá a je menej časovo i finančne náročná. Je to najviac rozšírený a sofistikovaný chemický analytický postup na kvantifikovanie frakcií N v krmivách (Schwab et al., 2003). Schému frakcionácie N-látok používa i Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), ktorý frakcionuje N- látky na päť frakcií s rôznou rýchlosťou degradácie (Sniffen et al., 1992; Tylutki et al., 2008; van Amburgh et al., 2012; a i.).

Podobne ako na stanovenie bachorovej degradovateľnosti aj na stanovenie intestinálnej stráviteľnosti existuje niekoľko metód, ktoré majú svoje prednosti a nedostatky, napr. metóda *in vivo* (Rohr et al., 1979 a i.), metóda mobilných vrecúšok (*mobile bag* metóda), ktorej používanie je veľmi rozšírené (De Boer et al., 1987; Frydrych, 1992; Taghizadeh et al., 2005; Homolka et al., 2007; Yayota et al., 2009; a i.) a metóda *in vitro* pomocou komerčných enzýmov (Setälä et al., 1984; Todorov a Grigorov, 1991; Calsamiglia a Stern, 1995 a i.). Schwaab et al. (2003) považujú poslednú uvedenú za výbornú alternatívu k *mobile bag* metóde. Z tejto metódy vychádza aj modifikovaná metóda aplikovaná na prístrojové zariadenie DAISYII, v ktorej sa využívajú proteolytické enzýmy. Pepsínom sa simuluje trávenie bielkovín v sleze a na trávenie zodpovedajúce v dvanástniku sa používa pankreatín, ktorý je zmesou trypsinu, amylázy a lipázy.

Z uvedených metód stanovenia bachorovej degradovateľnosti N- látok metóda *in situ* má najväčšie prednosti z dôvodu, že je to dynamický proces a krmivo je vystavené podmienkam trávenia podobným ako sú *in vivo* a rovnako je to i pri metóde *mobile bag* (Schwab, 2003).

Cieľom je rozšíriť metódy stanovenia rozsahu a rýchlosti degradácie jednotlivých frakcií N a intestinálnej stráviteľnosti o metódy rýchlejšie a menej prácne, avšak s dobrou presnosťou a opakovateľnosťou výsledkov. Náhrada používanej metódy *in situ* a *mobile bag* v procese hodnotenia krmív metódami *in vitro* umožní rýchlejšie získať aj ďalšie parametre o kvalite N- látok a tým aj o kvalite krmív, ktoré doplnia databázu krmív pre prežúvavce. To umožní vypracovať systém tvorby lepšie vybilancovaných krmných dávok s efektívnou utilizáciou živín (energie a N- látok) a tým menších strát N počas fermentácie v bachore a intermediárnom metabolizme. Avšak na to, aby sme mohli spomínané metódy porovnať, potrebujeme čo najväčšie množstvo údajov a charakteristík získaných metódou *in sacco* a *mobile bag* na zvieratách s voperovanými bachorovými a duodenálnymi kanylami v proximálnom duodene.

Jedným z hlavných cieľov projektu je zabezpečiť efektívnejšie využívanie, trvalú reprodukciu a ochranu prírodných a teda aj nutričných zdrojov, zvyšovanie kvality a potravinovej bezpečnosti. Kvalita živín a ich premena v procese trávenia ovplyvňuje produkciu živočíšnych produktov, kvalitu potravín, ekonomiku produkcie ako aj životné prostredie.

Výživa zvierat je bezprostredne spätá cez transformáciu živín z rastlín s prírodným prostredím, preto účinné a efektívne ovplyvnenie utilizácie krmív na živočíšne produkty je možné len neustálym prehlbovaním poznatkov. Úroveň utilizácie krmív je výsledkom dokonalého poznania výživnej hodnoty krmiva na jednej strane a potreby živín a energie pre zvieratá na strane druhej. Zámerom riešenia projektu je formulovať biologicky zdôvodnené parametre, postupy a stratégie využitia, úpravy, skladovania, transformácie a efektívneho zhodnotenia produkčného potenciálu domácich a perspektívnych nutričných zdrojov, so zámerom upresniť ich potrebu, podmienky efektívnej utilizácie živín v organizme zvierat a eliminovať negatívne pôsobenie na životné prostredie, zvierat a cez kvalitu živočíšnych produktov na človeka.

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

K predloženiu projektu nás viedla snaha, ale aj potreba zlepšiť, zjednodušiť metódy predikcie nutričnej hodnoty krmív pre prežúvavce.

Precíznosť kŕmenia prežúvavcov vyžaduje presnosť v predikcii krmných komponentov, v predikcii vzťahu medzi chemickým zložením krmív a bachorovou degradáciou, resp. črevnou stráviteľnosťou. Veľmi dôležité je vybilancovať bielkoviny a energiu v krmných dávkach. Hlavným cieľom v tejto oblasti je poskytnúť odporúčania (v chove dojníc), na základe ktorých je možné redukovat vstupy N a následných strát N počas produkcie mlieka a mäsa prežúvavcami.

Zlepšenie metód pre stanovenie rýchlosti a rozsahu degradácie krmiva a trávenia v gastro-intestinálnom trakte umožnia farmárom a výrobcam krmív vytvorenie krmných dávok pre dojnice (a ďalšie prežúvavce) s lepšou energetickou a N bilanciou čo následne zredukuje straty N, resp. bielkovín počas fermentácie v bachore a intermediárnom metabolizme.

Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:

V projekte sme skutočne použili 4 kusy hovädzieho dobytku – kravy (Holsteinské plemeno).

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

Zvieratám bola voperovaná intestinálna a bachorová kanyla po aplikácii celkového a lokálneho anestetika. Operačný zákrok vykonával skúsený veterinárny lekár s dlhoročnou praxou v danej oblasti. Po operácii sme zvieratám podávali analgetiká, aby sme obmedzili bolestivosť na minimum. Zdravotný stav zvierat bol dôsledne monitorovaný. Počas sledovaného obdobia nebolo zvieratám bránené v ich prirodzenom správaní. Boli dodržané štandardy chovu, umiestnenia a starostlivosti.

Predpokladaná úroveň krutosti:

Uplatňovanie zásad 3R

1. Nahradenie zvierat:

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

Na zistenie reálnej bachorovej degradovateľnosti a črevnej stráviteľnosti živín rôznych druhov krmív je nevyhnutné použitie kanylovaných zvierat. Jediné na živom organizme je možné získať exaktné výsledky. Použitie zvierat na takýto typ experimentu bolo nevyhnutné.

V súčasnosti existuje niekoľko rôznych metód *in vitro*, ktorými sa dá predikovať stráviteľnosť aj v laboratórnych podmienkach, ale aby boli tieto metódy čo najpresnejšie, musia sa odvodiť čo najpresnejšie regresné vzťahy. K odvodeniu týchto regresných vzťahov je nevyhnutné získať čo najviac charakteristík degradácie živín pomocou metódy *in sacco* a črevnej stráviteľnosti metódou *mobile bag*.

2. Redukcia počtu zvierat:

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

Vzhľadom na typ experimentu bude použitý minimálny počet zvierat, ktorý ešte stačí pre štatistické vyhodnotenie. V projekte použijeme 4 kusy hovädzieho dobytku – kravy. Metodika *in sacco* (Ørskov a McDonald, 1979) ukladá použitie minimálne 2 zvierat kvôli exaktnosti výsledkov a 1 zviera bude rezervné.

Pre stanovenie črevnej stráviteľnosti sú podľa metodiky potrebné paralelne 3 zvieratá pre testovanie 1 krmiva a 1 zviera je rezervné.

3. Zjemnenie:

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

Pri referenčnej metóde *in sacco* sa všeobecne využívajú kravy, vzhľadom na ich pomalší rast a v experimentoch ich je možné použiť dlhodobo. S týmto typom experimentov máme dlhoročné skúsenosti.

Pri operácii (vpravenie kanýl) bola bolesť obmedzená na minimum, následkom vhodného podávania sedatív, analgetík a anestetík.

Zvieratá sme postupne navykali na manipuláciu s nimi pri vkladaní a vyberaní vreciek, takže za krátku dobu bol a je stres úplne minimalizovaný.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno nie