

## AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU PO SPÄTNOM POSÚDENÍ

### **Názov projektu:**

**CR SB32** Kombinovaná štúdia toxicity po opakovanom podaní so skriningovým testom reprodukčnej/vývojovej toxicity (OECD 422).

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** Ro-4156/17-221, č. 2685/18-221b

### **Kľúčové slová v projekte:**

Toxicita po opakovanom podaní, reprodukčná toxicita, REACH

**Účel projektu:** Aplikovaný výskum

### **Ciele projektu:**

Cieľom projektu (štúdie) bolo poskytnúť podklady pre posúdenie bezpečnosti chemickej látky CR SB32 z hľadiska schopnosti vyvolať toxickú reakciu organizmu po opakovanom podaní látky a odhaliť potenciálne negatívne vplyvy na reprodukčné parametre podľa metódy OECD 422.

### **Prínos z vykonaného projektu:**

Experiment poskytol v plnom rozsahu informácie, ktoré sú v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadované. Pokusná a pozorovacia stratégia boli jednoznačne dané metodikou OECD 422, ktorá je alternatívou pre testy Reprodukčnej skriningovej toxicity (OECD 421) a 28-dňovej toxicity (OECD 407) kde sa sledujú nielen reprodukčné parametre testovaných zvierat, ale robí sa aj hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, vyšetrenie moču, patológia a histopatológia.

Na základe výsledkov štúdie boli stanovené hodnoty NOAEL pre reprodukčnú a systémovú toxicitu. Prínosom tejto štúdie bolo včasné rozpoznanie toxicity skúšanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

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

Bolo použitých 65 samcov + 77 samíc potkanov Wistar, narodilo sa 443 mlád'at

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

Bolo zabezpečené, aby akékoľvek zhoršenie zdravotného stavu zvierat bolo konzultované s veterinárnym lekárom a tieto zvieratá v prípade ťažkých stavov by boli humánne utratené.

V pilotnom pokuse, v ktorom sa vyberali dávky pre hlavný pokus boli zaznamenané úhyny zvierat, ako dôsledok podania testovanej látky. Keďže v štúdii s opakovaným podaním by minimálne jedna testovaná dávka mala spôsobiť toxické účinky, aby sa dali indikovať potenciálne cieľové miesta pri intoxikácii, museli byť do pilotného pokusu zaradené aj dávky, ktoré sú letálne. K úhynom došlo bez predchádzajúcich príznakov zhoršenia stavu.

V hlavnej štúdii prišlo tiež k úhynu zvierat. Letargia a piloereckcia bola u týchto zvierat pred úhynom pozorovaná. Okrem týchto nepriaznivých príznakov, žiadne ďalšie zhoršenie zdravotného stavu neboli zaznamenané. Všetky zostávajúce zvieratá prežívali bez viditeľných

príznakov toxicity, alebo zmien zdravotného stavu a správania. Rovnako neboli pozorované straty hmotnosti alebo redukovaná spotreba potravy.

#### **Úroveň krutosti:**

Pokus bol pri plánovaní hodnotený ako mierne krutý až krutý, keďže išlo o doposiaľ netestovanú látku a nedala sa vylúčiť systémová reakcia, ktorá by bola kategorizovaná ako krutá. Podľa výsledkov štúdie, experiment je možno vyhodnotiť ako krutý, vzhľadom na systémovú toxicitu pri najvyššej dávke.

#### **Uplatňovanie zásad 3R**

V projekte boli zohľadňované zásady 3R. V pokuse neboli vykonané bolestivé zákroky, pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť.

Zvieratá boli v pokuse - časť „pre-treatment“ (2 týždne) a „treatment“ (2 týždne) pred párením ustajnené skupinovo. Po párení boli samice, potenciálne matky, ustajnené individuálne v klietkach, ktoré umožňovali očný kontakt so susednými zvieratami. Počas celej štúdie bolo prostredie obohatené nádobami, ktoré súžili zvieratám ako úkryt. Tieto sú inertné, bezpečné, dobre udržiavateľné a nehrozí ich poškodenie ani zo strany zvierat.

Počty zvierat v pokuse boli primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu vychádzajúc z pravidiel OECD 422.

## AKTUALIZOVANÉ NETECHNICKÉ ZHRNUTIE PROJEKTU PO SPÄTNOM POSÚDENÍ

### Názov projektu:

**Diethyl ethyl phosphonate** Kombinovaná štúdia toxicity po opakovanom podaní so skriningovým testom reprodukčnej/vývojovej toxicity (OECD 422).

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** Ro-4156/17-221, č. 4609/17-221

### Kľúčové slová v projekte:

Toxicita po opakovanom podaní, reprodukčná toxicita, REACH

**Účel projektu:** Aplikovaný výskum

### Ciele projektu:

Cieľom projektu (štúdie) bolo poskytnúť podklady pre posúdenie bezpečnosti chemickej látky z hľadiska schopnosti vyvolať toxickú reakciu organizmu po opakovanom podaní látky a odhaliť potenciálne negatívne vplyvy na reprodukčné parametre podľa metódy OECD 422.

### Prínos z vykonaného projektu:

Experiment poskytol v plnom rozsahu informácie, ktoré sú v tomto teste z hľadiska platnej legislatívy REACH pre látky produkované v množstve do 100 ton/rok požadované. Pokusná a pozorovacia stratégia boli jednoznačne dané metodikou OECD 422, ktorá je alternatívou pre testy Reprodukčnej skriningovej toxicity (OECD 421) a 28-dňovej toxicity (OECD 407) kde sa sledujú nielen reprodukčné parametre testovaných zvierat, ale robí sa aj hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, vyšetrenie moču, patológia a histopatológia.

Na základe výsledkov štúdie boli stanovené hodnoty NOAEL pre reprodukčnú a systémovú toxicitu.

Prínosom tejto štúdie bolo včasné rozpoznanie toxicity skúšanej látky a zabránenie negatívnych vplyvov na organizmus.

### Druhy použitých zvierat a ich počty:

Bolo použitých 65 samcov + 77 samíc potkanov Wistar a narodilo sa 480 mláďat

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

Bolo zabezpečené, aby akékoľvek zhoršenie zdravotného stavu zvierat bolo konzultované s veterinárnym lekárom a tieto zvieratá v prípade ťažkých stavov by boli humánne utratené.

V pilotnom pokuse, v ktorom sa vyberali dávky pre hlavný pokus boli zaznamenané úhyny zvierat ako dôsledok podania testovanej látky. Keďže v štúdii s opakovaným podaním by minimálne jedna testovaná dávka mala spôsobiť toxické účinky aby sa dali indikovať potenciálne cieľové miesta pri intoxikácii, museli byť do pilotného pokusu zaradené aj dávky, ktoré sú letálne. Zaznamenané úhyny boli bez predchádzajúcich príznakov zhoršenia stavu.

V hlavnej štúdii prišlo tiež k úhynu zvierat. Letargia a piloerekcia bola u týchto zvierat pred úhynom pozorovaná. Okrem týchto nepriaznivých príznakov, žiadne ďalšie úhyny, alebo zhoršenie zdravotného stavu neboli zaznamenané. Všetky zvieratá prežívali bez viditeľných

príznakov toxicity, alebo zmien zdravotného stavu a správania. Rovnako neboli pozorované straty hmotnosti a redukovaná spotreba potravy.

### **Úroveň krutosti:**

Pokus bol pri plánovaní hodnotený ako mierne krutý až krutý vzhľadom na to, že išlo o doposiaľ netestovanú látku nedala sa vylúčiť systémová reakcia, ktorá by bola kategorizovaná ako krutá. Na základe výsledkov, experiment je možno vyhodnotiť ako krutý, vzhľadom na reprodukčnú toxicitu pri najvyššej dávke.

### **Uplatňovanie zásad 3R**

V projekte boli zohľadňované zásady 3R. V pokuse neboli vykonané bolestivé zákroky, pri ktorých je potrebné použiť látky zmierňujúce bolesť.

Zvieratá boli v pokuse - časť „pre-treatment“ (2 týždne) a „treatment“ (2 týždne) pred párením ustajnené skupinovo. Po párení boli samice, potenciálne matky, ustajnené individuálne v klietkach, ktoré umožňovali očný kontakt so susednými zvieratami. Počas celej štúdie bolo prostredie obohatené nádobami, ktoré súžili zvieratám ako úkryt. Tieto sú inertné, bezpečné, dobre udržiavateľné a nehrozí ich poškodenie ani zo strany zvierat.

Počty zvierat v pokuse boli primerané, redukované v maximálnej miere tak, aby sa nemohla ovplyvniť validita pokusu vychádzajúc z pravidiel OECD 422.

**Netechnické zhrnutie projektu:** Aktualizovanú zo spätnom posúdení

**Názov projektu:** Xenobiotiká a vývin preimplantačného embrya

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** Ro 2399/15-221

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** preimplantačné embryo, insekticídy, potravinové aditíva

**Účel projektu:** Základný výskum

**Ciele projektu:** Hlavným cieľom výskumu bolo získať informácie o účinkoch vybraných xenobiotík na skorý embryonálny vývin. Projekt bol zameraný na dva druhy substancií, ktoré predstavujú zdravotné riziko pre farmové, domáce, spoločenské zvieratá ale aj človeka: insekticídy a potravinové aditíva. Ich dopad na skorý reprodukčný potenciál samíc bol vyšetrovaný na myšiach. Projekt bol zameraný na štúdium vplyvu materskej intoxikácie na vývinový potenciál oocytov a preimplantačných embryí. Získané výsledky boli okrem toho zhodnotené i v kontexte materskej kondície (tzn. v kontexte aktuálneho fyziologického a metabolického stavu).

**Prínos z vykonaného projektu:** Výsledky analýzy preukázali, že prítomnosť vybraných účinných látok troch skupín insekticídov (fenylpyrazoly, neonikotinoidy, pyretroidy), komerčne dostupných prípravkov určených na hubenie hmyzu, známych sekundárnych zložiek insekticídnych produktov ako aj prídavných látok v potravinách v prostredí vyvíjajúceho sa embrya negatívne ovplyvnila vývin a kvalitu myšacích preimplantačných embryí. Keďže všetky druhy zvierat sú im vystavené buď vo forme vysokých jednorazových dávok (veterinárna prevencia a terapia parazitárnych ochorení) alebo vo forme dlhodobo prijímaných nízkych dávok (konzumácia obilia, zeleniny a ovocia kontaminovaného reziduami insekticídov) predstavujú reálnu hrozbu pre reprodukčné zdravie. Výsledky získané na embryách izolovaných z laboratórnych zvierat napomôžu pri zavádzaní preventívnych opatrení v rámci riadenia živočíšnej produkcie ako aj pri zabezpečovaní reprodukčného zdravia s cieľom znížiť neustále narastajúce prenatálne straty.

**Druhy použitých zvierat a ich počty:** Modelovým zvieratom bola myš laboratórna. Bolo použitých 2263 zvierat.

**Nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:** Vo väčšine experimentov samice myši slúžili výhradne ako daryne experimentálneho materiálu. Izolácie ocytov, preimplantačných embryí a pohlavných orgánov boli vykonané až po usmrtení zvierat. Výnimku tvoril čiastkový experiment, v ktorom sme prirodzene oplodnením samiciam myši podávali vo vode alebo v krmive insekticíd v koncentrácii neprekračujúcej dokumentovaný obsah reziduí nameraný v krmivách pochádzajúcich z insekticídmi ošetrovaných porastov. Počas realizácie projektu nebolo pozorované žiadne zhoršenie zdravotného stavu, ktoré by si vyžadovalo predčasné humánne usmrtenie pokusných zvierat. Zvieratá prežívali bez príznakov toxicity.

### **Úroveň krutosti:**

Plánované postupy vykonané na zvieratách (aplikácia hormónov na úpravu pohlavného cyklu, vyšetrovanie telového tuku) boli zaradené do kategórie krutosti „slabá“. Zvieratá v ich dôsledku nepociťovali žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach. Krátkodobé podávanie vody s prídavkom insekticídu bolo zaradené do kategórie krutosti „stredná“.

### **Uplatňovanie zásad 3R**

1. Nahradenie zvierat (Replacement): Plánované experimenty nebolo možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat. Databázy medzinárodne overených a uznaných alternatívnych metód ECVAM, ICCVAM, GO3R-PUBMED, NC3Rs, a CAAT neobsahovali takéto alternatívne metódy. Doterajšie poznatky o problematike neumožnili vytvorenie adekvátneho modelu in silico, ktorý by dokázal simulovať zložitý vzťah medzi chronickou intoxikáciou matky xenobiotikami a ich vplyvom na reprodukčné procesy. Väčšina plánovaných postupov bola založená na in vitro experimentoch, pri ktorých slúžili laboratórne zvieratá výhradne ako donor materiálu.

2. Redukcia počtu zvierat (Reduction): Plánované experimenty boli zostavené tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvierat'a. Počet použitých zvierat bol stanovený tak, aby bola zachovaná reprodukovateľnosť a validita pokusov. Usmrcovanie zvierat s následným zberom biologického materiálu bolo v postupe nastavené tak, aby mohlo byť vo vzorkách vyšetrených paralelne toľko parametrov, koľko bude technicky možné. Získavanie biologického materiálu sa ukončilo po dosiahnutí

adekvátneho množstva vzoriek nevyhnutných pre relevantné štatistické spracovanie výsledkov. Počet použitých zvierat v projekte bol 2263, čo bolo menej ako bol schválený maximálny počet 2486 myší.

3. Zjemnenie (Refinement): Plánované experimenty boli zostavené tak, aby sa minimalizovala bolesť, strach a utrpenie použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich narodenia až po usmrtenie. Zvieratá boli chované v štandardných podmienkach a ich usmrtenie bolo vykonané spôsobilými osobami humánnym spôsobom. Vzhľadom na skutočnosť, že príjem vody (aj keď krátkodobý) s prídavkom insekticídu mohol predstavovať zdravotné riziko, denné monitorovanie zdravotného stavu bolo zamerané na celkový vzhľad zvierat, telesné funkcie ako aj sociálne správanie. Počas experimentov sa nevyskytli zmeny zdravotného stavu zvierat.

**Projekt podlieha opätovnému schvaľovaniu:**    áno    nie

Projekt bol spätne posúdený aj napriek tomu, že najvyššia klasifikácia krutosti bola stredná. Členovia poradného orgánu navrhli projekt spätne posúdiť z dôvodu použitia veľkého množstva zvierat v súlade s § 36 ods. 2 písmeno f) NV 377/2012 Z.z.