



VIII KONFERENCJA ZWIERZĘTA W BADANIACH NAUKOWYCH





VIII KONFERENCJA ZWIERZĘTA W BADANIACH NAUKOWYCH

Olsztyn 2024

Patronat honorowy / Honorary patronage:

Krajowej Komisji Etycznej ds Doświadczeń na Zwierzętach
Polish National Committee for Ethics in Animal Research

Ministra Nauki
Minister of Science



Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi
Minister of Agriculture and Rural Development



Prezesa Polskiej Akademii Nauk
President of the Polish Academy of Sciences



Organizatorzy

VIII KONFERENCJI
ZWIERZĘTA W BADANIACH
NAUKOWYCH

Polskie Towarzystwo Nauk
o Zwierzętach Laboratoryjnych
oraz

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

składają serdeczne podziękowania Sponsorom,
którzy w istotny sposób przyczynili się do zorganizowania
i przeprowadzenia tego spotkania naukowego.

Mamy nadzieję, że kontakty i informacje uzyskane dzięki
naszej Konferencji dla wszystkich okażą się owocne.

Komitet Organizacyjny Konferencji

SPONSOR PLATYNOWY

animavivari 

SPONSORZY ZŁOCI:



SPONSORZY SREBRNI:



SPONSORZY BRĄZOWI:



Komitet naukowy / Scientific committee:

dr inż. / Ph.D. Marta Gajewska¹

dr hab. / Ph.D, D.Sc. Lidia Radko²

prof. dr hab. / Prof. Marcin Taciak¹

prof. dr hab. / Prof. DVM Krzysztof Wąsowicz³

prof. dr hab. / Prof. DVM Dariusz Skarżyński⁴

dr hab. inż. / Ph.D, D.Sc. Radosław Kowalski ⁴

dr hab. / Ph.D, D.Sc. Magdalena Weidner-Glunde⁴

dr hab. / Ph.D, D.Sc. Aneta Andronowska⁴

dr hab. / Ph.D, D.Sc. Dagmara Złotkowska⁴

Komitet organizacyjny / Organising committee:

dr inż. / Ph.D. Monika Mikulska¹

mgr / M.Sc. Monika Kwiatkowska⁵

dr / Ph.D. Marta Kopcewicz⁴

dr n. wet. / DVM, Ph.D Mamadou Moussa Bah⁴

inż. / Eng. Aleksandra Szymborska⁴

dr / Ph.D. Marek Bogacki⁴

mgr inż. / M.Sc. Katarzyna Jaworska⁴

dr n. wet. / DVM, Ph.D Katarzyna Piotrowska-Tomala⁴

dr / Ph.D. Joanna Fotschki⁴

dr inż. / Ph.D. Przemysław Zduńczyk⁴

¹Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie/ Warsaw University of Life Sciences

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu / Poznań University of Life Sciences

³Uniwersytet Warmińsko-Mazurski / University of Warmia and Mazury

⁴Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

/ Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences in Olsztyn

⁵Uniwersytet Warszawski / University of Warsaw

STRESZCZENIA WYKŁADÓW
ABSTRACTS OF LECTURES

WYKŁAD INAUGURACYJNY

The 3Rs in theory and practice

ARTI AHLUWALIA

Universita di Pisa, Italy

*adres do korespondencji: e-mail: arti.ahluwalia@unipi.it

Słowa kluczowe: 3R, limiting use of animals in research, ethics in research,
European 3R centers

The 3R concept is known by everyone working in biomedical science. But what do the 3Rs mean and is it possible to have a common vision? I will explain the origins and evolution of the 3Rs into what could be termed as a common definition of the Principles. Focusing on the ethical and scientific issues involved in biomedical research, I will describe the ongoing debates between people with differing viewpoints. I will also describe how the Italian Centro 3R was established and discuss its operation, its successes and challenges. Finally, the importance of coordination between European centers to widen the impact of scientific and dissemination efforts will be underlined.

Streszczenia ułożone są alfabetycznie

Cesarskie cięcie jako optymalna forma rederywacji i utrzymania hodowli SPF myszy laboratoryjnej

ALEKSANDRA BARTELIK^{1*}, ALENA KUBÁTOVÁ¹,
LUCIE ŠIMKOVÁ¹, MILADA ŠÍROVÁ¹

¹Institute of Microbiology of the CAS, v.v.i., Vídeňská 1083,
142 20 Prague 4 – Krč, Czech Republic

*adres do korespondencji: e-mail: aleksandra.bartelik@biomed.cas.cz

Słowa kluczowe: rederywacja, hodowla SPF myszy, cesarskie cięcie.

Zwierzętarnia Instytutu Mikrobiologii Czeskiej Akademii Nauk przeznaczona do utrzymania myszy laboratoryjnych, przez lata funkcjonowała na poziomie konwencjonalnym. Główne tematy badań z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych to immunologia, onkologia oraz mikrobiom. Celem standaryzacji badań, poprawienia odtwarzalności eksperymentów, ale przede wszystkim dla poprawy dobrostanu zwierząt, w roku 2016 postanowiono zainwestować w nową zwierzętarnię hodowlano-doświadczalną.

Nowy obiekt otwarto w 2023 roku i rozpoczęto proces przeniesienia hodowli zwierząt.

Myszy w konwencjonalnej kolonii były regularnie monitorowane, a wyniki badań były pozytywne dla: EDIM, MNV, *Muribacter muris*, *Pasteurella caecimuris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Helicobacter spp*, *Syphacia obvelata*, *Tritrichomonas muris*.

Przy planowaniu rederywacji braliśmy pod uwagę embriotransfer zarodków mysich do matek biorczyń zakupionych z hodowli SPF oraz cesarskie cięcie i przekazanie osesków matkom zastępczym. Ze względów technicznych, finansowych oraz stopnia inwazyjności zabiegów, zdecydowaliśmy się na transfer zwierząt z wykorzystaniem cesarskiego cięcia.

Zabieg cesarskiego cięcia wykonaliśmy według protokołu z laboratorium Genome-Microbiome Mismatch dr T. Hrnčířa, stosowany tam standardowo dla pozyskiwania zwierząt germ free.

Celem potwierdzenia powodzenia procesu rederywacji wykonaliśmy najpierw dla porównania badanie kontrolne zdrowia myszy z grupy matek zastępczych: program GLOBAL, laboratorium AnLab, Praga. Wyniki według rocznej listy FELASA były negatywne. Z testów dodatkowych uzyskaliśmy informację o obecności *Pneumocystis murina*.

Kolejne badanie, już od potomstwa uzyskanego cesarskim cięciem i wychowanego przez matki zastępcze, również dało negatywne wyniki. Ponadto systematycznie przeprowadzane w naszej zwierzętarni badania kontrolne (ostatnie czerwiec 2024), nadal są negatywne.

Uzyskane wyniki wskazują, że procedura cesarskiego cięcia skutecznie eliminuje patogeny z pierwotnej kolonii, co czyni ją optymalną metodą dla rederywacji kolonii myszy laboratoryjnych.

Caesarean section as an optimal form of rederivation and maintenance of laboratory mouse colony on SPF level

ALEKSANDRA BARTELIK^{1*}, ALENA KUBÁTOVÁ¹,
LUCIE ŠIMKOVÁ¹, MILADA ŠÍROVÁ¹

¹ Institute of Microbiology of the CAS, v.v.i., Videňská 1083,
142 20 Prague 4 – Krč, Czech Republic

*correspondence address: aleksandra.bartelik@biomed.cz

Keywords: rederivation, SPF mouse colony, caesarean section

The Animal Facility of the Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences has housed laboratory mice at a conventional standard for years, focusing on immunology, oncology, and microbiome research. To enhance research quality, improve reproducibility, and ensure better animal welfare, a new breeding and experimental facility was commissioned in 2016 and opened in 2023.

The transfer of mouse colonies began following the opening of the new facility.

Mice in the conventional colony were regularly monitored and tested positive for various pathogens, including EDIM, MNV, *Muribacter muris*, *Pasteurella caecimuris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Helicobacter spp.*, *Syphacia obvelata*, *Tritrichomonas muris*.

We considered embryo transfer to SPF recipient mothers or caesarean section with pup transfer to SPF surrogate mothers for the rederivation process. Due to technical, financial, and procedural constraints, we chose the caesarean section method.

We followed the caesarean section protocol from Dr. T. Hrnčíř's Genome-Microbiome Mismatch Laboratory, which they standardly used it for obtaining germ-free animals.

To verify rederivation success, we first tested the health of mice from the surrogate mothers' group using the GLOBAL program at AnLab, Prague. Results according to the FELASA annual list were negative for all tested pathogens. Additional tests showed us *Pneumocystis murina*.

Subsequent health tests on offspring obtained by caesarean section and raised by surrogate mothers also returned negative results. Monitoring tests conducted systematically in our animal facility (the last one June 2024) further confirmed these findings.

These results indicate that the caesarean section procedure effectively eradicates pathogens from the original colony, making it the optimal method for rederiving laboratory mouse colonies.

Zasady 3R – wykorzystanie bezkręgowców w badaniach naukowych

KAMILA BOBREK

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

*adres do korespondencji: e-mail: kamila.bobrek@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: 3R, zastąpienie, bezkręgowce, muszka owocowa, barciak większy

Zasada 3R w odniesieniu do doświadczeń na zwierzętach wiąże się z prowadzeniem odpowiedzialnych i humanitarnych badań i dotyczy: Replacement – zastępowania zwierząt metodami *in vitro* lub organizmami o niższym stopniu rozwoju, Reduction – ograniczenia liczby zwierząt oraz Refinement – udoskonalenia metod polegających na minimalizacji cierpienia i stresu oraz poprawę dobrostanu. Zastąpienie jest stosowane jako pierwszy etap eliminacji zwierząt z doświadczenia – jest to zastąpienie wyższych zwierząt kręgowych przez hodowle tkankowe lub komórkowe, embryony kręgowców lub zwierzęta bezkręgowce [1]. Wśród bezkręgowców najpopularniejszymi modelami badawczymi są muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*), nicien glebowy (*Caenorhabditis elegans*) czy barciak większy (*Galleria mellonella*). Muszka owocowa jest wykorzystywana do badań dotyczących chorób człowieka, zarówno chorób genetycznych, neurodegeneracyjnych, nowotworowych jak i do oceny skuteczności leków ze względu na podobieństwo w szlakach biochemicznych regulujących kilka podstawowych procesów komórkowych [2]. Nicien *Caenorhabditis elegans*, jest przezroczystym nicieniem mającym 60-80% genów wspólnych z człowiekiem, dzięki czemu wykorzystywany jest w badaniach dotyczących mechanizmów metabolicznych, neuroendokrynnych, a także w badaniach chorób neurodegeneracyjnych i embrionalnych [3]. Larwy barciaka większego są natomiast wykorzystywane najczęściej do badań nad patogenezą drobnoustrojów będących źródłem zakażeń u człowieka i zwierząt oraz skutecznością substancji terapeutycznych, zarówno syntetyzowanych chemicznie jak i substancji naturalnych. Model ten służy powszechnie do badania toksyczności i skuteczności antybiotyków, środków przeciwgrzybiczych i nowych farmaceutyków [4].

Zaletami użycia bezkręgowców jako modeli doświadczalnych są: krótki cykl życiowy i duża rozrodczość, mniejsza ilość genów i niższe koszty utrzymania w porównaniu ze zwierzętami kręgowymi. Modele te powinny być w miarę możliwości standardowo używane w początkowej analizie poprzedzającej konwencjonalne testy *in vivo* oraz w celu zmniejszenia liczby rutynowych testów na ssakach [2,4].

Literatura:

- [1] Schollenberger A. Zasada 3R w ochronie zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych. *Życie Weterynaryjne*. 2017; 92(6):424-426
- [2] Pratomy AR, Salim E, Hori A, Kuraishi T. Drosophila as an Animal Model for Testing Plant-Based Immunomodulators. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(23):14801
- [3] Dyczkowska AA, Chabowska-Kita A. Caenorhabditis elegans as a model organism in obesity research. *BioTechnologia*. 2021;102(3):337-362.
- [4] Mikulak E, Gliniewicz A, Przygodzka M, Solecka J. Galleria mellonella L - organizm modelowy stosowany w badaniach biomedycznych i innych. *PRZEGL EPIDEMIOLOG* 2018;72(1): 57-73

The 3 Rs - the use of invertebrates in scientific research

KAMILA BOBREK

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

*correspondence address: kamila.bobrek@upwr.edu.pl

Keywords: 3R, replacement, invertebrates, fruit fly, greater wax moth

The 3R principle in animal experiments is related to conducting responsible and humane research and includes: Replacement - using *in vitro* methods or organisms with a lower stage of development instead animals, Reduction - limiting the number of animals and Refinement - improving methods of minimizing suffering and stress, take care about the animal welfare. Replacement is used as the first step in eliminating animals from an experiment - it is the replacement of vertebrate animals by tissue or cell cultures, vertebrate embryos or invertebrate animals [1]. Among invertebrates, the most popular research models are the fruit fly (*Drosophila melanogaster*), the soil nematode (*Caenorhabditis elegans*) and the greater wax moth (*Galleria mellonella*). The fruit fly is used for research on human diseases, including genetic, neurodegenerative and cancer diseases, as well as for assessing the effectiveness of drugs due to the similarity in biochemical pathways regulating several basic cellular processes [2]. The nematode *Caenorhabditis elegans* is a transparent nematode that has 60-80% of its genes in common with humans, which is why it is used in research on metabolic and neuroendocrine mechanisms, as well as in the study of neurodegenerative and embryonic diseases [3]. The greater wax moth larvae are most often used for research on the pathogenesis of microorganisms that are the source of infections in humans and animals and the effectiveness of therapeutic substances, both chemically synthesized and natural substances. This model is commonly used to study the toxicity and effectiveness of antibiotics, antifungals and new pharmaceuticals [4].

The advantages of using invertebrates as experimental models are: short life cycle and high reproduction, fewer genes and lower maintenance costs compared to vertebrate animals. These models should be widely used as standard

(if it's possible) for initial analysis prior to conventional *in vivo* testing and to reduce the number of routine mammalian tests [2,4].

References:

- [1] Schollenberger A. Zasada 3R w ochronie zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych. Życie Weterynaryjne. 2017; 92(6):424-426
- [2] Pratomo AR, Salim E, Hori A, Kuraishi T. Drosophila as an Animal Model for Testing Plant-Based Immunomodulators. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(23):14801
- [3] Dyczkowska AA, Chabowska-Kita A. Caenorhabditis elegans as a model organism in obesity research. BioTechnologia. 2021;102(3):337-362.
- [4] Mikulak E, Gliniewicz A, Przygodzka M, Solecka J. Galleria mellonella L - organizm modelowy stosowany w badaniach biomedycznych i innych. PRZEGL EPIDEMIOLOG 2018;72(1): 57-73

Trójwymiarowe modele komórkowe do badań 3R

PROF TIZIANA A.L. BREVINI, PHARMD PHD

Laboratory of Biomedical Embryology and Tissue Engineering,
University of Milan, Italy
tiziana.brevini@unimi.it

Coraz więcej dowodów sugeruje, że różnice między mikrośrodowiskiem tworzonym przez tradycyjne modele hodowli komórek *in vitro* a tymi w tkankach *in vivo* są znaczące i mogą powodować odchylenia w odpowiedzi komórek i ich zachowaniu. To z kolei ma duży wpływ na translację wyników z laboratorium do praktyki klinicznej, co nieuchronnie prowadzi do konieczności stosowania dużej liczby testów na zwierzętach doświadczalnych. Choć jest oczywiste, że modele komórek *in vitro* są jednym z kamieni milowych współczesnych badań naukowych, ze względu na ich elastyczność, stosunkowo niewielkie rozmiary i łatwość użycia, konieczny jest ogromny wysiłek w celu ciągłego ich udoskonalania, aby zapewnić ich przewidywalność. W tej prezentacji przedstawiam przegląd różnych strategii stosowanych w celu stworzenia szeregu dobrze scharakteryzowanych, powtarzalnych trójwymiarowych platform *in vitro*, które wypełniają lukę między złożonością *in vivo* a zbyt uproszczonymi tradycyjnymi dwuwymiarowymi (2D) kulturami *in vitro*. Te nowo stworzone kultury trójwymiarowe dokładniej odzwierciedlają to, co normalnie dzieje się w tkankach żywych organizmów, zachowując oryginalne interakcje międzykomórkowe, zapewniając proliferację komórek, wzmacniając różnicowanie oraz utrzymując morfologię i zachowanie komórek, przy optymalnym dostępie do składników odżywczych.

3D cell models for 3R research

PROF. TIZIANA A.L. BREVINI, PHARMD PHD

Laboratory of Biomedical Embryology and Tissue Engineering,
University of Milan, Italy
tiziana.brevini@unimi.it

Growing evidence suggests that the differences between the microenvironment provided by traditional *in vitro* cell culture models and those of *in vivo* tissues are significant and can cause deviations in cell response and behaviour. This is, in turn, heavily affecting the translation of results from bench to bedside, and inevitably, causes the use of large numbers of experimental animal testing. While it is clear that *in vitro* cell models are one of the milestones of present scientific investigation, due to their flexibility, relatively small size and ease, a huge effort needs to be addressed to their continuous improvement, in an attempt to ensure their predictive capability. I provide an overview of different strategies applied to generate a number of well-characterized, reproducible 3D *in vitro* platforms that bridge the gap between the *in vivo* complexity and the over-simplified conventional two-dimension (2D) *in vitro* cultures. These newly created tridimensional cultures more accurately reflect what normally happens within the tissues of the living organisms, preserving the original cell–cell and cell–ECM interactions, ensuring cell proliferation, boosting differentiation and maintaining cell morphology and behaviour, beside an optimal access to nutrients.

Znieczulenie i metody uśmierzania bólu u miniaturowej świnki getyńskiej (Göttingen Minipig).

ELŻBIETA BUDZIŃSKA-WRZESIEN^{1*}, ROBERT WRZESIEN²

¹ Warszawski Uniwersytet Medyczny, Centrum Biostruktury

² Warszawski Uniwersytet Medyczny, Centralne Laboratorium Zwierząt Doświadczalnych

*adres do korespondencji: e-mail: elzbieta.budzinska-wrzesien@wum.edu.pl

Słowa kluczowe: Göttingen Minipig, dobrostan, znieczulenie

Miniaturowa świnka getyńska (Göttingen Minipig) jako jedyna rasa świń należy do zwierząt laboratoryjnych. Hodowana jest wyłącznie w celu prowadzenia badań i eksperymentów. Popularny ostatnio model doświadczalny, to wynik skrzyżowania trzech różnych ras świń: Minnesota Minipig, Vietnamese Potbelly i German Landrace, wybranych ze względu na ich wyjątkowe cechy takie jak: mały rozmiar, łagodne usposobienie, genetyka, podobieństwo do ludzi. Cechy te czynią ją szczególnie atrakcyjną dla badań biomedycznych, ponieważ umożliwiają uzyskanie jasnych i jednoznacznych wyników naukowych. Rasa ta jest bardzo przyjazna, pozbawiona agresji czy strachu wobec opiekunów. Ma także małe wymagania dotyczące utrzymania. Jednak trzeba pamiętać o mocnym instynkcie stadnym i budowaniu hierarchii stada nawet 5-6 osobniczej. Dla utrzymania dobrostanu na właściwym poziomie niezbędne jest dostosowanie wzbogaceń, które muszą zapewnić zajęcie tym bardzo inteligentnym zwierzętom.

Zapewnienie dobrostanu miniaturowych świnek getyńskich poprzez uwzględnienie ich potrzeb fizjologicznych, społecznych, bytowych i behawioralnych ma bardzo duży wpływ zarówno na przebieg całego eksperymentu jak i na wyniki końcowe prowadzonych doświadczeń.

Należy pamiętać o tym, że procedury, których konsekwencją może być dotkliwy ból, powinny być przeprowadzane w znieczuleniu ogólnym lub miejscowym oraz by zastosowane były środki przeciwbólowe lub inna odpowiednia metoda, która gwarantuje zmniejszenie do minimum bólu, cierpienia i dys stresu. Dlatego jednym z ważnych aspektów prowadzonych badań jest odpowiednie przygotowanie zwierzęcego pacjenta do zabiegu, które ma istotny wpływ na przebieg samej operacji, a także na samopoczucie zwierzęcia po zakończonym zabiegu.

Znieczulenie i jakość opieki pooperacyjnej u świnki miniaturowej rządzi się tymi samymi prawami, co u innych zwierząt.

W zależności od prowadzonego eksperymentu istotny jest wybór odpowiedniego rodzaju znieczulenia (np. domięśniowe, dożylnie lub wziewne) i w związku z tym przygotowanie odpowiedniego sprzętu, anestetyków, a także wybór najlepszego schematu znieczulenia.

Kolejną ważną sprawą jest opieka pooperacyjna, która ma zapewnić dobrostan zwierzęciu poddanemu procedurom eksperymentalnym.

Literatura:

- [1] <https://minipigs.dk/about-gottingen-minipigs/genetic-foundation>
- [2] DYREKTYWA PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych

Anaesthesia and pain-relieving methods in the Göttingen Minipig

ELŻBIETA BUDZIŃSKA-WRZESIEN¹*, ROBERT WRZESIEN²

¹ Medical University of Warsaw, Center for Biostructure Research

² Medical University of Warsaw, Central Laboratory for Experimental Animals

*correspondence address: e-mail: elzbieta.budzinska-wrzesien@wum.edu.pl

Keywords: Göttingen Minipig, animal welfare, anaesthesia

The Göttingen Minipig is the only breed of pig with laboratory animal status. It is bred solely for research purposes. This recently popular experimental model is the result of crossing three different breeds: Minnesota Minipig, Vietnamese Potbelly and German Landrace, each selected due to its distinguished characteristics such as small size, gentle disposition, genetics and similarity to humans. These are what makes this breed particularly attractive for biomedical research, as they enable clear and unambiguous scientific results. Göttingen Minipig is friendly, displays a lack of aggression or fear towards its caregivers, and have low accommodation requirements. However, its strong herd instinct and need for building a herd hierarchy even with 5-6 specimens should be recognized. Adopting enrichments ensuring entertainment of this very intelligent animal is crucial to maintaining its appropriate welfare.

Ensuring that its physiological, social, vital and behavioural needs are met has significant impact on the course of the entire trial as well as final results.

One should bear in mind that procedures potentially causing severe pain are to be carried out under general or local anaesthesia and that analgesics or other appropriate methods guaranteeing minimal amount of pain, suffering and distress should be applied. Therefore, the proper preparation of the animal patient for procedures, which significantly impacts the course of the surgery and the animal's well-being afterwards is an important aspect of a trial.

Anaesthesia, as well as the quality of postoperative care for a Göttingen Minipig follows the same standards as for other animals.

Depending on the trial, choosing the appropriate type of anaesthesia (e.g., intramuscular, intravenous or inhalation) and preparing the proper equipment, anaesthetics as well as selecting the best anaesthesia scheme is crucial.

Postoperative care, ensuring the welfare of the animal on which experimental procedures are carried out is also key.

References:

- [1] <https://minipigs.dk/about-gottingen-minipigs/genetic-foundation>
- [2] DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010

Translated by: Magdalena Wrzesień

Profil lipidomiczny narządów u myszy szczepów C57BL/6, BALB/c i CD1

KATARZYNA BURLIKOWSKA^{1*}, JOANNA BOGUSIEWICZ¹,
BOGUMIŁA KUPCEWICZ², KAROL JAROCH¹, IGA STRYJAK¹,
BARBARA BOJKO^{1*}

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Wydział Farmaceutyczny, ul. Jurasza 2, 85-094 Bydgoszcz, Polska

¹Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej,

²Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

* adres do korespondencji: e-mail: bbojko@cm.umk.pl, k.burlikowska@cm.umk.pl

Słowa kluczowe: szczep myszy, tkanka, profil lipidomiczny, mikroekstrakcja do fazy stałej

Lipidomika jest dziedziną metabolomiki, zajmującą się identyfikacją oraz analizą ilościową związków lipidowych [1]. Pełen zestaw lipidów (lipidom) w danej komórce, tkance, narządzie czy organizmie jest tzw. „lipidowym odciśnięciem palca” badanego materiału biologicznego. Skuteczną metodą służącą do niecelowanej analizy lipidomicznej tkanek jest mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), wykorzystująca pokryte biokompatybilnym sorbentem włókna o średnicy 200 μm i umożliwiające ekstrakcję analitów bez istotnego uszkodzenia badanej struktury („biopsja chemiczna”) [2].

Celem badań było porównanie lipidomu wątroby, nerek, mózgu i mięśnia udowego u myszy trzech szczepów powszechnie używanych w badaniach biomedycznych: C57BL/6, BALB/c i CD1. Myszy (samce, wiek 12 tygodni, $n=5$ w grupie) utrzymywano w kontrolowanych warunkach środowiskowych: temp. $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-godzinny cykl świetlny, wilgotność $55 \pm 10\%$, karma i woda dostępne *ad libitum*. Po przerwaniu rdzenia kręgowego narządy zostały usunięte. W celu ekstrakcji metabolitów włókna SPME natychmiast umieszczano w każdym badanym narządzie. Desorpcję związków lipidowych przeprowadzano w roztworze izopropanol-metanol (1:1), a następnie próbki analizowano z wykorzystaniem chromatografu cieczowego sprzężonego z wysokorozdzielczym spektrometrem mas.

Analizę chemometryczną przeprowadzono dla 84 lipidów o potwierdzonej strukturze (ceramidy, fosfatydylocholiny, sfingolipidy oraz lizofosfatydylocholiny). Analiza głównych składowych (PCA) wskazała wyraźne różnice

w profilach lipidomicznych próbek mózgu, wątroby, nerek i mięśni (niezależnie od szczepu). Porównanie lipidomów metodą ASCA (analiza wariacji z jednoczesną analizą składowych) wykazała, że istotne statystycznie są zarówno efekty główne, czyli szczep myszy organ, jak i ich interakcja. Zgodnie z przewidywaniem znacząco większy wpływ zaobserwowano dla rodzaju organu (ok. 69%), niż dla rodzaju szczepu (ok. 4%). Modele PLS-DA (dyskryminacyjny wariant regresji metoda czastkowych najmniejszych kwadratów) dla próbek nerki i wątroby umożliwiły rozróżnienie profili lipidomicznych tych organów dla trzech szczepów myszy. Natomiast profile lipidomiczne mózgu i mięśni dla wszystkich szczepów myszy były do siebie znacząco podobne.

Przeprowadzone badania wskazują, że „lipidowy odcisk palca” powinien być brany pod uwagę przy interpretacji danych uzyskanych z badań biomedycznych prowadzonych na popularnych szczepach mysich, często używanych zamiennie.

Literatura:

- [1] Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci.* 954-969 (2016). doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.010.
- [2] Bojko, B. Solid-phase microextraction: a fit-for-purpose technique in biomedical analysis. *Anal Bioanal Chem* 414, 7005–7013 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04138-9>

Lipidomic profile of organs in C57BL/6, BALB/c and CD1 mice

KATARZYNA BURLIKOWSKA^{1*}, JOANNA BOGUSIEWICZ¹,
BOGUMIŁA KUPCEWICZ², KAROL JAROCH¹, IGA STRYJAK¹,
BARBARA BOJKO^{1*}

Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz,
Jurasza 2, 85-094 Bydgoszcz, Poland

¹Department of Pharmacodynamics and Molecular Pharmacology,

²Department of Inorganic and Analytical Chemistry,

*correspondence address: e-mail: bbojko@cm.umk.pl, k.burlikowska@cm.umk.pl

Keywords: mouse strain, tissue, lipidomic profile, solid-phase microextraction

Lipidomics is a field of metabolomics that deals with the identification and quantitative analysis of lipid compounds [1]. The complete set of lipids (lipidome) in each cell, tissue, organ or organism is the "lipid fingerprint" of the studied biological material. An effective method for untargeted lipidomic analysis of tissues is solid-phase microextraction (SPME), which uses 200 μm diameter fibers coated with a biocompatible sorbent and allows for the extraction of analytes without significant damage to the structure being studied ("chemical biopsy") [2].

The study aimed to compare the lipidome of the liver, kidneys, brain and thigh muscle in three strains of mice commonly used in biomedical research: C57BL/6, BALB/c and CD1. Mice (male, 12 weeks old, $n=5$ in a group) were maintained in controlled environmental conditions: temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-h light cycle, humidity $55 \pm 10\%$, food and water available *ad libitum*. After cervical dislocation, the organs were removed. For metabolite extraction, SPME fibers were immediately placed in each organ examined. Desorption of lipid compounds was performed in the isopropanol-methanol (1:1) solution, and then samples were analyzed using a liquid chromatograph coupled to a high-resolution mass spectrometer.

Chemometric analysis was performed for 84 lipids with confirmed structures (ceramides, phosphatidylcholines, sphingolipids, and lysophosphatidylcholines). Principal component analysis (PCA) indicated apparent differences

in lipidomic profiles of brain, liver, kidney, and muscle samples (irrespective of strain). Comparison of lipidomes using the ASCA method (analysis of variance with simultaneous component analysis) indicated that the main effects, i.e., mouse strain and organ, and their interaction were statistically significant. As expected, a significantly greater effect was observed for the type of organ (approx. 69%) than for the strain (approx. 4%). PLS-DA models (partial least square regression – discriminant analysis) for kidney and liver samples enabled the differentiation of lipidomic profiles of these organs for the three mouse strains. On the other hand, lipidomic profiles of the brain and muscles for all mouse strains were significantly similar.

The studies indicated that the "lipid fingerprint" should be considered when interpreting data obtained from biomedical studies conducted on common mouse strains, often used interchangeably.

References:

- [1] Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci.* 954-969 (2016). doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.010.
- [2] Bojko, B. Solid-phase microextraction: a fit-for-purpose technique in biomedical analysis. *Anal Bioanal Chem* 414, 7005–7013 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04138-9>

Problemy w badaniach dobrostanu zwierząt dziko żyjących

PIOTR CZYŻOWSKI

Katedra Etologii Zwierząt i Łowiectwa, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
e-mail: piotr.czyzowski@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: ocena dobrostanu, zwierzęta dziko żyjące, monitoring

Spośród wielu definicji dobrostanu zwierząt, w stosunku do zwierząt dziko żyjących, najlepiej odnosi się ta, która określa tym terminem stan zdrowia fizycznego i psychicznego organizmu znajdującego się w stanie pełnej równowagi ze środowiskiem w którym żyje. W porównaniu do zwierząt hodowlanych i towarzyszących, zwierzęta wolno żyjące są bardziej uzależnione od środowiska przyrodniczego, gdyż stanowią z nim nierozzerwalną całość i każda ingerencja w środowisku wpływa na funkcjonowanie ich populacji.

Celem opracowania jest przedstawienie problemów związanych z oceną poziomu dobrostanu zwierząt dziko żyjących oraz omówienie wybranych badań prowadzonych przez Katedrę Etologii Zwierząt i Łowiectwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, dotyczących omawianego zagadnienia.

Pojęcie dobrostanu w odniesieniu do zwierząt dzikich jest nierozzerwalnie związane z szeregiem czynników takich jak warunki fizjograficzne, klimat czy antropopresja. Do oceny poziomu dobrostanu służą między innymi metody diagnostyki klinicznej i laboratoryjnej oraz badania etologiczne, uwzględniające adekwatność reaktywności behawioralnej zwierząt w odniesieniu do etogramu gatunkowego. Szacowanie poziomu dobrostanu zwierząt dzikich z wykorzystaniem wszystkich elementów „pięciu wolności” jest dość problematyczne. Na przykład identyfikacja behawioralnych wskaźników odczuwania bólu czy stresu przez zwierzęta dziko żyjące może być dość trudna ze względu na gatunkowe strategie ochronne. Obiektywnym wskaźnikiem dobrostanu może być poziom hormonów stresu, stanowiących odpowiedź organizmu na zmianę warunków środowiskowych. Najczęstszym materiałem biologicznym do oznaczenia stężenia hormonów stresu jest krew. Badania te jednak są obciążone błędem, bowiem pobieranie krwi generuje dodatkowy stres, a w pewnych warunkach jest to po prostu niepraktyczne, zwłaszcza przy badaniach zwierząt dziko żyjących. Trudne w praktyce badawczej jest także samo pobranie materiału badaw-

czego, jego transport i przechowywanie. Wydaje się, że w odniesieniu do zwierząt dziko żyjących powinno wykorzystywać się materiał biologiczny, który stanowi stabilne odzwierciedlenie ekspozycji organizmu na czynniki stresogenne. Wymogi te spełniają przede wszystkim włosy i pióra, ale także mocznik i kał.

W sposób nieinwazyjny dobrostan zwierząt dzikich można szacować również na podstawie wskaźników populacyjnych takich jak: liczebność i zagęszczenie, struktury populacyjne oraz wskaźniki rozrodu i śmiertelności. Parametry te pozwalają na ocenę dopasowania populacji do środowiska, a także decydują o jakości osobniczej zwierząt (kondycji, zdrowotności) pośrednio charakteryzując poziom dobrostanu.

Do oceny dobrostanu zwierząt dziko żyjących reprezentujących gatunki łowne z powodzeniem stosuje się pomiar parametrów opisujących kondycję osobniczą, takich jak: masa i rozmiary ciała (tuszy), masa poroża, pomiar zapasów tłuszczowych, poziom kreatyniny oraz obecność pasożytów. Problematyczny jest jednak fakt, iż tego typu materiał do badań poziomu dobrostanu zwierząt łownych jest dostępny tylko w okresach polowań. Poza okresem polowań nie ma możliwości pozyskania materiału badawczego w postaci tusz zwierząt bez specjalnych pozwoleń, co uniemożliwia pełne, całoroczne monitorowanie stanu kondycji osobniczej zwierząt. Pomocna w tym względzie może być analiza tusz zwierząt będących ofiarami wypadków komunikacyjnych, które zdarzają się w profilu całorocznym, co stwarza możliwość pozyskania materiału badawczego poza sezonem łowieckim. Dodatkowo wypadki drogowe są zdarzeniami losowymi, przez co materiał pobrany od zwierząt padłych w wyniku kolizji jest bardziej obiektywny niż materiał uzyskany w wyniku odstrzału łowieckiego opartego na zasadach selekcji osobniczej.

Szacowanie dobrostanu w oparciu o obserwacje behawioralne można z powodzeniem przeprowadzać na zwierzętach utrzymywanych w hodowlach zamkniętych, takich jak hodowle fermowe jeleniowatych, parki dzikich zwierząt itp. Wyniki tych badań i obserwacji mogą być traktowane jako próba zerowa (pełna kontrola stada, optymalne warunki pokarmowe, mniejszy wpływ niekorzystnych czynników klimatycznych, brak stresu związanego z drapieżnictwem, opieka weterynaryjna itp.) do porównań z populacjami zwierząt dziko żyjących.

Monitorowanie poziomu dobrostanu zwierząt dzikich jest oczywistą potrzebą, niezbędne jest więc opracowanie metod opartych o wykorzystanie miarodajnych, a jednocześnie łatwo dostępnych wskaźników. Umożliwiłoby to również efektywne zarządzanie populacjami zwierząt dzikich w celu ograniczenia szkód ekologicznych oraz utrzymania optymalnego poziomu ich dobrostanu.

Problems in wildlife welfare research

PIOTR CZYŻOWSKI

Department of Animal Ethology and Wildlife Management,
University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland
e-mail: piotr.czyzowski@up.lublin.pl

keywords: welfare assessment, wildlife, monitoring

Of the many definitions of animal welfare about wild animals, the one that applies best is the one that defines this term as the state of physical and mental health of an organism in total equilibrium with the environment in which it lives. Compared to farm and companion animals, free-living animals are more dependent on the natural environment, as they are an inseparable whole from it, and any interference with the environment affects the functioning of their population.

This study aims to present the problems of assessing the level of welfare of wild animals and to discuss selected research conducted by the Department of Animal Ethology and Hunting at the University of Life Sciences in Lublin on the issue in question.

The concept of welfare for wild animals is inextricably linked to several factors such as physiographic conditions, climate and anthropopressure. Among other things, clinical and laboratory diagnostic methods and ethnological studies, which consider the adequacy of animal behavioural reactivity about the species ethogram, are used to assess the level of welfare. Estimating the level of welfare of wild animals using all elements of the "Five Freedoms" is quite problematic. For example, identifying behavioural indicators of pain or stress in wildlife can be pretty tricky due to species-specific conservation strategies. An objective indicator of welfare may be the level of stress hormones, which are the body's response to a change in environmental conditions. The most common biological material for determining stress hormone levels is blood. However, these tests are subject to error, as blood collection generates additional stress, and under certain conditions, it is impractical, especially when studying wildlife. Also tricky in research practice is collecting the test material and its transportation and storage. Biological material that provides a stable reflection of the organism's exposure to stressors should be used for wildlife.

These requirements are met primarily by hair and feathers but also by urine and faeces.

In a non-invasive way, the welfare of wild animals can also be estimated based on population indicators such as abundance and density, population structures, and reproductive and mortality rates. These parameters allow us to assess the fit of the population to the environment and determine the individual quality of the animals (condition, healthiness), indirectly characterizing the level of welfare.

To assess the welfare of game animals, the measurement of parameters describing the condition of individuals, such as body (carcass) weight and size, antler weight, measurement of fat reserves, creatinine levels and parasite infestation status, are successfully used. However, it is problematic that this type of material for studying the level of welfare of game animals is only available during hunting periods. Outside of the hunting season, obtaining research material in the form of animal carcasses is impossible without special permits, which prevents complete, year-round monitoring of the condition of individual animals. Analysis of carcasses of animals that are victims of traffic accidents, which occur in a year-round profile, may be helpful in this regard, which creates the possibility of obtaining research material outside the hunting season. In addition, traffic accidents are random events, which makes the material taken from collision-dead animals more objective than the material obtained from hunting shoots based on the principles of individual selection.

Welfare estimations based on behavioural observations can be successfully carried out on animals kept in confined farms, such as deer farms, wildlife parks, etc. The results of these studies and observations can be treated as a null sample (complete herd control, optimal feeding conditions, less influence of adverse climatic factors, lack of predation stress, veterinary care, etc.) for comparisons with wildlife populations.

Monitoring the level of wildlife welfare is an obvious need, and it is necessary to develop methods based on authoritative yet readily available indicators. Knowing such indicators would enable effective management of wildlife populations to reduce ecological damage and maintain optimal levels of wildlife welfare.

Pies jako model w badaniach porównawczych *in vitro* nad nowotworami hematopoetycznymi u ludzi

EWA BARBARA DEJNAKA^{1*},
BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ¹,
ALEKSANDRA PAWLAK¹

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Farmakologii
i Toksykologii ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław, Polska
*adres do korespondencji: ewa.dejnaka@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: nowotwory hematopoetyczne, hodowle *in vitro*, pies

Wprowadzenie: Choroby onkologiczne to cywilizacyjny problem zarówno zwierząt towarzyszących jak i ludzi. Identyfikacja nowych biomarkerów nowotworowych i odkrycie nowych celów terapeutycznych ma zasadnicze znaczenie w ulepszaniu istniejących oraz tworzeniu nowych terapii przeciwnowotworowych zarówno w medycynie człowieka jak i medycynie weterynaryjnej. W odróżnieniu od zwierząt laboratoryjnych takich jak myszy czy szczury, u psów nowotwory występują spontanicznie oraz wykazują znaczące podobieństwa anatomiczne, fizjologiczne oraz genetyczne do nowotworów występujących u ludzi, co sprawia, że badania nad biologią nowotworów u psów mają charakter porównawczy do nowotworów człowieka.

Prawo regulujące proces rejestracji leków zakłada, że każda substancja o charakterze potencjalnego środka leczniczego musi być poddana badaniom skuteczności m.in. oznaczana jest jej aktywność antyproliferacyjna wobec komórek nowotworowych, która jest niezbędna do określenia prawidłowego działania oraz bezpieczeństwa leku.

W badaniach tych kluczową rolę odgrywają metody alternatywne wykorzystujące modele *in vitro*, zgodne z zasadą 3R (replacement – zastąpienie, reduction – redukcja, refinement – udoskonalenie) [1]. Przykładami ustalonych linii komórkowych psa wykorzystywanych w badaniach aktywności chemioterapeutyków *in vitro* są linie komórkowe nowotworów hematopoetycznych: CLB70 (przewlekłej białaczki limfatycznej z komórek B), GL-1 (białaczki B-komórkowej), CLBL-1 (chłoniaka z komórek B) oraz CNK-89 (chłoniaka z komórek NK) [2].

Koncepcja pracy: Hodowle komórek psa są użytecznym modelem do badań *in vitro* do określania cytotoksyczności potencjalnych leków przeciwnowotworowych stosowanych w medycynie człowieka. Większość metod opartych o hodowle *in vitro* wykorzystuje dwuwymiarowe (2D) hodowle komórkowe. Dzięki licznym, dobrze scharakteryzowanym, ustalonym liniom komórkowym chłoniaków i białaczek psa możliwa jest precyzyjna ocena skuteczności i toksyczności związków o potencjale chemioterapeutycznym w medycynie człowieka.

Wnioski: Modele *in vitro* wykorzystujące hodowle komórek psa stanowią cenne narzędzie w procesie odkrywania i rozwoju nowych leków przeciwnowotworowych stosowanych w medycynie człowieka. Ponadto pozwalają zmniejszyć koszty badań i ryzyko wejścia do fazy klinicznej toksycznych kandydatów na leki bez narażania ludzi oraz ograniczają liczbę zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Literatura:

- [1] Freires IA, Sardi JC, de Castro RD, Rosalen PL. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical Research*. 2017, 34(4): 681–686.
- [2] Pawlak A, Ziolo E, Kutkowska J, Błazejczyk A, Wietrzyk J, Krupa A, Hildebrand W, Dziegiel P, Dzimira S, Obminska-Mrukowicz B, Strzadala L, Rapak A. A novel canine B-cell leukaemia cell line. Establishment, characterisation and sensitivity to chemotherapeutics. *Veterinary Comparative Oncology*. 2017 Dec;15(4):1218-1231.

The dog as a model for comparative *in vitro* studies of human hematopoietic tumors

EWA BARBARA DEJNAKA^{1*},
BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ¹,
ALEKSANDRA PAWLAK¹

¹ Wrocław University of Environmental and Life Sciences,
Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology
ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław, Polska

*correspondence address: ewa.dejnaka@upwr.edu.pl

Keywords: hematopoietic tumors, *in vitro* culture, dog

Introduction: Oncological diseases are a civilizational problem for both companion animals and humans. Identification of new cancer biomarkers and discovery of new therapeutic targets is crucial to improving existing and creating new anticancer therapies in both human and veterinary medicine. Unlike laboratory animals such as mice or rats, cancers in dogs occur spontaneously and show significant anatomical, physiological and genetic similarities to cancers occurring in humans, which makes research on the biology of cancers in dogs comparative to human cancers.

The drug registration law process assumes that each substance with the nature of a potential therapeutic agent must be subjected to safety efficacy tests, including determination of its antiproliferative activity against cancer cells which is necessary to determine the mechanism of action and safety of the drug. In these studies, alternative methods using *in vitro* models, following the 3R principle (replacement, reduction, refinement) play a key role [1]. Examples of established canine cell lines used in *in vitro* studies of chemotherapeutic activity include hematopoietic tumor cell lines: CLB70 (B-cell chronic lymphocytic leukemia), GL-1 (B-cell leukemia), CLBL-1 (B-cell lymphoma), and CNK-89 (natural killer-cell lymphoma) [2].

Study concept: Canine cell cultures are a useful *in vitro* model for determining the cytotoxicity of potential anticancer drugs used in human medicine. Most *in vitro* methods use two-dimensional (2D) cell cultures. Thanks to the numerous, well-characterized, established cell lines of canine lymphomas and

leukemias, it is possible to precisely assess the efficacy and toxicity of compounds with chemotherapeutic potential activity in human medicine.

Conclusions: *In vitro* models using canine cell cultures are a valuable tool in the process of discovering and developing new anticancer drugs used in human medicine. In addition, they allow to reduce the costs of research and the risk of entering the clinical phase of toxic drug candidates without exposing humans and limit the number of animals used for research purposes.

References:

- [1] Freires IA, Sardi JC, de Castro RD, Rosalen PL. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical Research*. 2017, 34(4): 681–686.
- [2] Pawlak A, Ziolo E, Kutkowska J, Blazejczyk A, Wietrzyk J, Krupa A, Hildebrand W, Dziegiel P, Dzimira S, Obminska-Mrukowicz B, Strzadala L, Rapak A. A novel canine B-cell leukaemia cell line. Establishment, characterisation and sensitivity to chemotherapeutics. *Veterinary Comparative Oncology*. 2017 Dec;15(4):1218-1231.

Wpływ błonnika pokarmowego i nanocząsteczek miedzi na metabolizm wątrobowy. Badania na modelu szczura Wistar

BARTOSZ FOTSCHKI¹, KATARZYNA OGNIK²,
MILENA JUŚKIEWICZ^{2,3}, IRENA GODYCKA-KŁOŚ¹,
DOROTA NAPIÓRKOWSKA¹, EWELINA CHOLEWIŃSKA²,
ANNA STĘPNIEWSKA², PRZEMYSŁAW ZDUŃCZYK¹,
JERZY JUŚKIEWICZ^{1*}

¹ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polska Akademia Nauk,
Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Polska

² Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Katedra Biochemii i Toksykologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Polska

³ Naukowe Koło Biochemików, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
Akademicka 13, 20-950 Lublin, Polska

*adres do korespondencji: email: j.juskiewicz@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: Wątroba, błonnik pokarmowy, nanomiedź, metabolizm lipidów, szczur.

Zastosowanie nano-miedzi (CuNP) w produktach konsumenckich wzbudziło poważne obawy dotyczące jej potencjalnego wpływu na zdrowie. CuNP wykazują szeroki zakres skutków dla organizmu konsumenta, zarówno pozytywnych, jak i negatywnych [1]. Nasze wcześniejsze badania wykazały ochronną rolę błonnika pokarmowego przed działaniem CuNP w jelicie cienkim [2]. Jednak kombinowany wpływ błonnika pokarmowego i CuNP na czynność wątroby nie został jeszcze zbadany. Niniejsze badanie ma na celu ocenę czterech różnych źródeł błonnika pokarmowego (celulozy, inuliny, psyllium i pektyny) z CuNP na metabolizm wątrobowy.

Samce szczurów Wistar karmiono standardową pół-syntetyczną dietą dla szczurów uzupełnioną dwoma różnymi dawkami Cu (6,5 i 13 mg/kg diety) i różnymi rodzajami błonnika pokarmowego. Dieta kontrolna zawierała mieszanekę mineralną z CuCO₃ i 8% -celulozy. W grupach eksperymentalnych CuCO₃ zastąpiono CuNP, a 6% -celulozy zastąpiono preparatami błonnika (inuliną, psyllium lub pektyną). Badanie zostało zatwierdzone przez Lokalną Komisję ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgoda nr 19/2021; Olsztyn, Polska).

Badanie wykazało, że dawka CuNP miała znaczący wpływ na poziom tłuszczu wątrobowego, cholesterolu i trójglicerydów oraz mogła zakłócać metabolizm glukozy. Suplementacja psyllium i inuliną łagodzi negatywne skutki CuNP poprzez regulację metabolizmu lipidów i zapalenia wątroby. Korzystny efekt może być związany z obniżeniem poziomu markerów molekularnych wątroby związanych z metabolizmem lipidów i stanem zapalnym (SREBP1c, COX-2 i PPAR-gamma). Co więcej, włączenie psyllium do diety spowodowało znaczne obniżenie poziomu glukagonu we krwi. Badanie to podkreśla potencjał wykorzystania CuNP i psyllium do regulacji metabolizmu wątroby.

Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Grant nr 2021/41/B/NZ9/01104.

Literatura:

- [1] Adetunji et al. (2022). Potentialities of nanomaterials for the management and treatment of metabolic syndrome: A new insight. *Materials Today Advances*, 13, 100198–100198. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2021.100198>.
- [2] Cholewińska et al. (2023). The Effect of Copper Nanoparticles and a Different Source of Dietary Fibre in the Diet on the Integrity of the Small Intestine in the Rat. *Nutrients*, 15(7), 1588. <https://doi.org/10.3390/nu15071588>

Effect of dietary fiber and copper nanoparticles on hepatic metabolism. Studies on a Wistar rat model

BARTOSZ FOTSCHKI¹, KATARZYNA OGNIK²,
MILENA JUŚKIEWICZ^{2,3}, IRENA GODYCKA-KŁOS¹,
DOROTA NAPIÓRKOWSKA¹, EWELINA CHOLEWIŃSKA²,
ANNA STĘPNIOWSKA², PRZEMYSŁAW ZDUŃCZYK¹,
JERZY JUŚKIEWICZ^{1*}

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research,

Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland

² Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Animal Sciences
and Bioeconomy, University of Life Sciences, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

³ Biochemistry Research Club, University of Life Sciences in Lublin,
Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

*correspondence address: e-mail: j.juskiewicz@pan.olsztyn.pl

Keywords: Liver, dietary fibre, nano-copper, lipid metabolism, rat.

Using nano-copper (CuNPs) in consumer products has raised significant concerns regarding its potential health implications. CuNPs exhibit a wide range of effects on the consumer body, both positive and negative [1]. Our previous research showed the protective role of dietary fiber against CuNPs effects in the small intestine [2]. However, the combined effect of dietary fibre and CuNPs on liver function has not yet been investigated. This research aims to evaluate four different dietary fibre sources (cellulose, inulin, psyllium and pectin) with CuNPs on liver metabolism.

Male Wistar rats were fed a standard semi-purified rat diet supplemented with two different doses of Cu (6.5 and 13 mg/kg diet) and various types of dietary fibre. The control diet contained a mineral mixture with CuCO₃ and 8% of -cellulose. In the experimental groups, CuCO₃ was replaced with CuNPs, and 6% of the -cellulose was substituted with fibre preparations (inulin, psyllium or pectin). The study was approved by the Animal Experiments in Olsztyn Local Animal Care and Use Committee (Approval No. 19/2021; Olsztyn, Poland).

The study found that the dosage of CuNPs had a significant impact on hepatic fat, cholesterol, and triglyceride levels and could interfere with glucose metabolism. The supplementation with psyllium and inulin mitigates the negative effects of CuNPs by regulating lipid metabolism and hepatic inflammation. The favourable effect might be associated with the downregulation of liver molecular markers related to lipid metabolism and inflammation (SREBP1c, COX-2, and PPAR-gamma). Moreover, the incorporation of psyllium into the diet resulted in a significant reduction in blood glucagon levels. This study emphasizes the potential of using CuNPs and psyllium to regulate liver metabolism.

This work was financed by the National Science Centre, Grant No. 2021/41/B/NZ9/01104.

Literatura:

- [1] Adetunji et al. (2022). Potentialities of nanomaterials for the management and treatment of metabolic syndrome: A new insight. *Materials Today Advances*, 13, 100198–100198. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2021.100198>.
- [2] Cholewińska et al. (2023). The Effect of Copper Nanoparticles and a Different Source of Dietary Fibre in the Diet on the Integrity of the Small Intestine in the Rat. *Nutrients*, 15(7), 1588. <https://doi.org/10.3390/nu15071588>

Znaczenie opieki przed i pooperacyjnej w kontekście przeżywalności i dobrostanu gryzoni laboratoryjnych

ALEKSANDRA GAJEWSKA^{1*}, KATARZYNA MARSZAŁEK¹,
MAŁGORZATA DOMŻAŁSKA¹, SANDOR KANTOR²,
EWA SOKOŁOWSKA¹

¹Transpharmation Ltd., Olsztyn, Poland

²Transpharmation Ltd, London, UK

*adres do korespondencji: aleksandra.gajewska@transpharmation.com

Słowa kluczowe: C57BL/6J, opieka okołoperacyjna, dobrostan

Okres okołoperacyjny jest kluczowy dla zwierząt laboratoryjnych poddawanych zabiegom chirurgicznym. W następstwie operacji może dochodzić do zwiększonego odczuwania bólu i zaburzeń dobrostanu. Istnieje również zwiększone ryzyko upadków wynikające z podwyższonego poziomu stresu, anestezji oraz zakażeń śród- i pooperacyjnych. Odpowiednie przygotowanie zwierząt do zabiegu oraz właściwa opieka pooperacyjna mają krytyczny wpływ na przeżywalność i dobrostan zwierząt.

Celem pracy jest zaprezentowanie protokołu postępowania okołoperacyjnego stworzonego na potrzeby procedury wszczepienia transmitera EEG HD-X02¹.

Do opracowania schematu wykorzystano 15 samców szczepu C57BL/6J. Zwierzęta zostały poddane zabiegowi wszczepienia transmiterów HD-X02 (prod. DSI) polegającym na umieszczeniu urządzenia w jamie otrzewnej myszy, podskórnym przeprowadzeniu elektrod w okolicy czaszki oraz umieszczeniu ich na powierzchni opony twardej mózgu i w mięśniach karku.

Przed zabiegiem zadbano o odpowiednie zabezpieczenie przeciwbólowe zwierząt i ich nawodnienie oraz przygotowanie pola operacyjnego.

Okres pooperacyjny podzielono na trzy etapy:

1. Bezpośrednio po zabiegu zwierzęta, w klatkach indywidualnych, umieszczano pod lampą grzewczą na czas co najmniej 1 godziny
2. Następnie przez 5 dni utrzymywano je w szafach grzewczych (temp. 25°C, wilg. 47%). W tym czasie zwierzętom podawano podskórnie roztwór ketoprofenu w dawce 5mg/kg i ogrzany do 37°C roztwór witaminowo elektrolitowy w dawce 1 ml/dzień.

- Przez kolejnych 9 dni zwierzęta utrzymywano w standardowym pomieszczeniu kolonijnym – w zależności od kondycji do 10 dnia rekonwalescencji opcjonalnie podawano ogrzany roztwór witaminowo elektrolitowy. Zapewniono nieograniczony dostęp do namoczonej paszy oraz wody.

Przez cały okres pooperacyjny kontrolowano masę ciała, spożycie wody oraz paszy, obserwowano behavior myszy, ich postawę oraz sprawdzano proces gojenia ran pooperacyjnych.

Największy spadek masy ciała nastąpił między 2 a 4 dniem po zabiegu ($p < 0.001$), po tym czasie masa zwierząt miała tendencję wzrostową. Między 7 a 8 dniem rekonwalescencji zwierzęta odzyskiwały masę ciała sprzed operacji.

Wnioski:

Przy zastosowaniu opisanego protokołu postępowania, przeżywalność zwierząt w okresie pooperacyjnym wyniosła 95-100%.

Wzrost masy ciała obserwowano w 4 dniu po zabiegu.

Powrót do masy ciała sprzed zabiegu następował, średnio, między 7 a 8 dniem rekonwalescencji.

¹ Data Sciences International

Importance of pre- and post-operative regimen in the survival and welfare of laboratory rodents

ALEKSANDRA GAJEWSKA^{1*}, KATARZYNA MARSZAŁEK¹,
MAŁGORZATA DOMŻALSKA¹, SANDOR KANTOR²,
EWA SOKOŁOWSKA¹

¹Transpharmation Ltd., Olsztyn, Poland

²Transpharmation Ltd, London, UK

*adres do korespondencji: aleksandra.gajewska@transpharmation.com

Keywords: C57BL/6J mice, peri-operative care, welfare

The perioperative period is crucial for laboratory animals undergoing surgery. Invasive procedures often lead to increased pain, welfare disturbances, and a heightened risk of deaths due to stress, anesthesia, and the potential for intra- and postoperative infections. Adequate surgical preparation and proper postoperative care are essential for animal survival and welfare.

This study presents a pre- and postoperative protocol developed for the HD-X02¹ EEG transmitter implantation procedure. Twelve male C57BL/6J mice were used to develop this regimen. The implantation involved placing the device in the peritoneal cavity, subcutaneously guiding the electrodes to the cranial region, and positioning them on the dura mater surface of the brain and inside the nuchal muscles.

During the preoperative period, measures were taken to ensure the animals were adequately pain-relieved, hydrated, and that the surgical field was aseptically prepared. Postoperative care was divided into three stages:

1. Immediately after surgery, the animals were placed in individual cages under a heating lamp for at least one hour.
2. For the five days following the procedure, the animals were kept in heating cabinets (25°C, 47% humidity) and received subcutaneous injections of ketoprofen (5 mg/kg) and a heated vitamin-electrolyte solution (1 ml/day).
3. For the subsequent nine days, the animals were maintained in a standard colony room. Depending on their condition, the heated vitamin-electrolyte solution was optionally administered until the 10th day of recovery.

Wetted food pellet and water were available at libitum.

Throughout the postoperative period, body weight, water and food intake, behaviour, posture, and wound healing were monitored.

The most significant reduction in body weight was observed between postoperative days 2 and 4 ($p < 0.001$). Subsequently, the animals exhibited a tendency for weight gain. By days 7th and 8th of the recovery period, the animals had returned to their preoperative body weight.

Conclusions:

Using the described management protocol, the survival rate during the postoperative period was 95-100%.

Weight gain was observed from the 4th day following surgery.

The animals returned to their preoperative body weight, on average, between the 7th and 8th day of recovery period.

¹ Data Sciences International

Wzmocnienie funkcji wzrokowych u myszy z zaburzeniami widzenia leczonych opsynami

ANNA GALIŃSKA^{1*}, JAGODA PŁACZKIEWICZ¹,
KATARZYNA KORDECKA¹, KAROLINA SARAN¹,
ANNA POSŁUSZNY¹, ANDRZEJ T. FOIK¹

¹ Międzynarodowe Centrum Badań Oka (ICTER), Instytut Chemii Fizycznej
Polskiej Akademii Nauk, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, Polska

*adres do korespondencji: agalinska@ichf.edu.pl

Słowa kluczowe: terapia genowa, wirus wścieklizny, opsyny, optogenetyka

Miliony ludzi na całym świecie są obecnie dotknięte wadami wzroku. Głównymi przyczynami tych zaburzeń są nieodwracalne zmiany w strukturze siatkówki i mutacje genetyczne, które powodują obumieranie fotoreceptorów w siatkówce. Chociaż istnieją obiecujące badania, nie znaleziono jeszcze skutecznej metody przywracania wzroku osobom dotkniętym zaburzeniami widzenia [1]. Wysiłki koncentrują się na zapobieganiu całkowitej utracie fotoreceptorów i przywracaniu wzroku w przypadkach całkowitej degeneracji fotoreceptorów. Jednym z podejść do leczenia zaburzeń wzrokowych jest wirusowa terapia genowa, która dostarcza wraz z białkami, zwane opsynami, do ocalałych komórek siatkówki [2].

Kanałorodopsyna-2 (ang. Channelrhodopsin-2, ChR2) jest światłoczułym kanałem jonowym, który absorbuje światło niebieskie z pikiem aktywacyjnym przy 470 nm. ChR2 została uznana za narzędzie do genetycznie ukierunkowanej zdalnej kontroli optycznej (optogenetyki) neuronów i obwodów neuronalnych [3]. CsChrimson to opsyna której zakres aktywacji przesunięty jest ku czerwieni, o czułości na światło w zakresie od 510 do 640 nm i szczątkowej czułości na światło niebieskie. Możliwe zatem, że dostarczenie ChR2 oraz csChrimson za pomocą wirusa wścieklizny (RV) mogłoby potencjalnie przywrócić wzrokowe i selektywne odpowiedzi w zwierzęcym modelu zwyrodnienia siatkówki.

Celem tego projektu było zbadanie, czy zdegenerowana siatkówka zakażona wirusem wścieklizny z delecją białka G wprowadzającym opsyny (Δ G-RV-csChrimson-ChR2-mCherry) może przywrócić funkcje wzrokowe u myszy.

Aby to zrobić, dostarczyliśmy wirusa do oka poprzez wstrzyknięcie do ciała szklistego i przeprowadziliśmy stymulację optogenetyczną oraz zapisy pojedynczych neuronów w pierwotnej korze wzrokowej i wzgórku górnym mysiego modelu zwyrodnienia fotoreceptorów Rho^{P23H}. Nasze wyniki pokazały, że dostarczanie opsyny za pomocą RV przywróciło odpowiedź na stymulację światłem niebieskim oraz światłem żółtym w zdegenerowanej siatkówce. Wierzymy, że wektor RV będzie skutecznym nośnikiem białek terapeutycznych, takich jak opsyny, dostarczanych do chorej siatkówki.

Literatura:

- [1] Andrzej T. Foik et al., *The Journal of Neuroscience* (2018), doi:10.1523/JNEUROSCI.1279-18.2018.
- [2] Antoine Chaffiol et al., *Molecular Therapy* (2017), doi:10.1016/j.ymthe.2017.07.011.
- [3] Boris V. Zemelman et al., *Neuron* (2002), doi:10.1016/S0896-6273(01)00574-8.

Finansowanie

Narodowe Centrum Nauki, Polska (2019/34/E/NZ5/00434)

Narodowe Centrum Nauki, Polska (2020/39/D/NZ4/01881)

Narodowe Centrum Nauki, Polska (2022/47/B/NZ5/03023)

Fundacja na rzecz Nauki Polskiej (FENG.02.01-IP.05-T005/23) w ramach programu Międzynarodowe Agendy Badawcze (MAB FENG) współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego

Enhancement of visual functions in visually impaired mice treated with opsins

ANNA GALIŃSKA^{1*}, JAGODA PŁACZKIEWICZ¹,
KATARZYNA KORDECKA¹, KAROLINA SARAN¹,
ANNA POSŁUSZNY¹, ANDRZEJ T. FOIK¹

¹ International Centre for Translational Eye Research, Institute of Physical Chemistry,
Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

*correspondence address: agalinska@ichf.edu.pl

Keywords: gene therapy, rabies virus, opsins, optogenetics

Millions of people around the world are currently affected by vision impairments. The main causes of these impairments are irreversible alterations in retinal structure and genetic mutations that result in photoreceptor cell death in the retina. Although there is some promising research, an effective method to restore vision in those affected has yet to be found [1]. Efforts are focused on preventing total photoreceptor loss and restoring vision in cases of complete photoreceptor degeneration. One of the most straightforward approach to curing blindness appears to be viral gene therapy, which delivers light-sensitive proteins known as opsins to the surviving retinal cells [2].

Channelrhodopsin-2 (ChR2) is a light-activated ion channel that absorbs blue light, with peak activation at 470 nm. ChR2 has been established as a tool for genetically targeted optical remote control (optogenetics) of neurons and neural circuits [3]. CsChrimson is a red-shifted opsin with light sensitivity in the range of 510 to 640 nm and residual sensitivity to blue light. Thus, delivering ChR2 and csChrimson using the rabies virus (RV) technique could potentially restore visually evoked and selective responses in an animal model of retinal degeneration.

This project aimed to investigate whether the degenerated retina infected with G-deleted rabies virus that carries opsins (Δ G-RV-csChrimson-ChR2-mCherry) can restore the visual responses in mice. To do so, we delivered the virus to the eye by intravitreal injection and performed optogenetic stimulation and single neuron recordings in the primary visual cortex and the superior colliculus of Rho^{P23H} mouse model of photoreceptor degeneration. Our

results showed that opsin delivery via RV restored the response to the blue light and yellow light stimulation in a degenerated retina. We believe that the RV vector will be an efficient carrier of therapeutic protein such as opsins delivered to a diseased retina.

References:

- [1] Andrzej T. Foik et al., *The Journal of Neuroscience* (2018), doi:10.1523/JNEUROSCI.1279-18.2018.
- [2] Antoine Chaffiol et al., *Molecular Therapy* (2017), doi:10.1016/j.ymthe.2017.07.011.
- [3] Boris V. Zemelman et al., *Neuron* (2002), doi:10.1016/S0896-6273(01)00574-8.

Funding

National Science Center, Poland (2019/34/E/NZ5/00434)
National Science Center, Poland (2020/39/D/NZ4/01881)
National Science Center, Poland (2022/47/B/NZ5/03023)
Foundation for Polish Science (FENG.02.01-IP05-T005/23) carried out within the International Research Agendas (IRAP FENG) programme co-financed by the European Union under the European Regional Development Fund

Niechciany gość z Dalekiego Wschodu: inwazja niepożądanego gatunku czebaczka amurskiego *Pseudorasbora parva* (Schlegel, 1842), w Warszawie.

PAWEŁ WRÓBLEWSKI*, RAFAŁ MACIASZEK,
NORBERT GAŁKA

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Hodowli Zwierząt, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*adres do korespondencji: pawel_wroblewski@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: ichtiofauna, inwazyjne gatunki obce, obszary miejskie.

Inwazyjne gatunki obce są obecnie poważnym problemem dla bioróżnorodności. Jednym z gatunków stwarzających zagrożenie dla polskiej ichtiofauny jest czebaczek amurski *Pseudorasbora parva*, który do tej pory był spotykany jedynie w Śródlądowych wodach otwartych, jeziorach oraz stawach akwakultury. Niniejsze badanie stanowi pierwsze stwierdzenie występowania *P. parva* na terenie miejskim w Polsce.

Przeprowadzone odłowory odbywały się w oparciu o stanowiska *P. parva* wcześniej zgłoszone przez osoby prywatne na terenie Warszawy. Ryby odławiano w trzech typach akwenów: staw w parku Morskie Oko (zbiornik półnaturalny), staw w Ogrodzie Saskim (zbiornik sztuczny), Potok Służewiecki (potok). Badania obejmowały pomiary morfometryczne ciała ryb a także ich liczebność. Podczas odłowory wykonywano też podstawowe parametry wody w akwenach. Odłowory wykonywano w październiku i grudniu 2020 roku oraz marcu, kwietniu i czerwcu 2021 roku.

Stwierdzono *P. parva* we wszystkich akwenach w Warszawie. W badaniu złowiono 59 osobników w stawie w parku Morskie oko, 74 w stawie w Ogrodzie Saskim i 7 w Potoku Służewieckim. Zaobserwowano osobniki młode. Co więcej po sezonie zimowym, w zbiorniku w Ogrodzie Saskim odłowiono kilka sztuk *P. parva*. Przeprowadzone analizy oraz obserwacje pozwoliły wskazać, że miejskie akweny są sprzyjającym siedliskiem dla *P. parva*. Niskie temperatury wody zimą mogą nie stanowić przeszkody dla przetrwania populacji *P. parva*. Jeśli nie zostaną podjęte żadne działania należy się spodziewać dalszego rozprzestrzeniania gatunku. Należy oczekiwać pojawienia się *P. parva* w innych wodach miejskich. Zaleca się wdrożenie regularnego monitoringu środowiska i środków zwalczania na zajętych i okolicznych obszarach.

Unwanted guest from the Far East: Invasion of the undesirable species stone moroko *Pseudorasbora parva* (Schlegel, 1842) in Warsaw.

PAWEŁ WRÓBLEWSKI*, RAFAŁ MACIASZEK,
NORBERT GAŁKA

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Hodowli Zwierząt, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*correspondence address: pawel_wroblewski@sggw.edu.pl

Keywords: ichthyofauna, invasive species, urban areas.

Invasive alien species are currently a serious threat to biodiversity. One of the species posing a threat to the ichthyofauna of Poland is the stone moroko, *Pseudorasbora parva*, which until now has been found only in inland open waters, lakes, and aquaculture ponds. This study provides the first record of the occurrence of *P. parva* in an urban area in Poland.

The fish sampling was conducted based on locations of *P. parva* previously reported by private individuals within Warsaw. The fish were caught in three types of water bodies: the pond in Morskie Oko Park (a semi-natural reservoir), the pond in the Saxon Garden (an artificial reservoir), and the Służewiecki Stream (a stream). The study involved morphometric measurements of the fish and their abundance. Basic water parameters in the water bodies were also measured during the sampling. Sampling was conducted in October and December 2020 and March, April, and June 2021.

In all the water bodies we found *P. parva*. A total of 59 specimens were caught in the pond in Morskie Oko Park, 74 in the pond in the Saxon Garden, and 7 in the Służewiecki Stream. Juvenile individuals were observed. Furthermore, after the winter season, several *P. parva* were caught in the Saxon Garden pond. The analyses and observations conducted indicated that urban water bodies are favorable habitats for *P. parva*. Low water temperatures in winter may not pose a barrier to the survival of the *P. parva* population. If no measures are taken, further species spread can be expected. It is anticipated that *P. parva* will appear in other urban waters. It is recommended to implement regular environmental monitoring and control measures in occupied and surrounding areas.

Mysz laboratoryjna jako zwierzę modelowe w procesie kształcenia studentów uczelni o profilu biologiczno-przyrodniczym

NORBERT DANIEL GAŁKA*, MARTA GAJEWSKA,
WIESŁAW ŚWIDEREK

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

*adres do korespondencji: norbert_galka@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: student, kształcenie, praktyka, mysz laboratoryjna,

Praktyczne przygotowanie do zawodu jest nieodzownym elementem kształcenia specjalistów takich jak zootechnicy, lekarze weterynarii, biolodzy i biotechnolodzy. Konwencjonalna zwierzętarnia (myszarnia) SGGW w Warszawie daje studentom możliwość nabycia praktycznego doświadczenia w pracy z myszami laboratoryjnymi. W trakcie studiów studenci biorą udział w zajęciach teoretycznych (wykłady i ćwiczenia seminaryjne), pozwalających zdobyć podstawową wiedzę z zakresu szeroko rozumianej wiedzy o zwierzętach laboratoryjnych. Drugą częścią są ćwiczenia praktyczne, podczas których wykonują podstawowe działania z zakresu chowu i hodowli myszy laboratoryjnych, a także prace związane z codziennym funkcjonowaniem zwierzętarni. W zajęciach tych wykorzystywane są tylko myszy pochodzące ze specjalnie wyhodowanego w tym celu stada „dydaktycznego”. Zwierzęta te charakteryzują się spokojniejszym behawiorem i mniejszym poziomem lęklności niż przeciętne myszy laboratoryjne. Dodatkowym atutem stada jest zróżnicowanie morfologiczne pod względem umaszczenia i budowy okrywy włosowej. Zwierzęta „dydaktyczne” nie biorą udziału w procedurach doświadczalnych. Po zakończeniu „misji” ze studentami większość tych myszy kierowanych zostaje do adopcji (studenci i fundacja LabRescue). Zajęcia w myszarni pozwalają zaznajomić studentów z praktyką jednostki utrzymującej zwierzęta. Ćwiczenia dotyczą m.in. organizacji pracy, zasad BHP, bioasekuracji, postępowania ze zwierzętami, przygotowania sprzętu hodowlanego i doświadczalnego oraz prowadzenia hodowli i tworzenia dokumentacji hodowlanej i doświadczalnej. Utrzymywane stado „dydaktyczne” jest również wykorzystywane do praktycznej nauki pod-

staw genetyki – studenci mają okazję poznać zwierzęta o różnych umaszczeniach i typach sierści (wstęp do dziedziczenia cech jakościowych), dokonują również pomiarów zwierząt (wstęp do dziedziczenia cech ilościowych). Studenci wybranych kierunków uczestniczą także w autopsjach zwierząt. Dokonane obserwacje są podstawą do dalszych zajęć seminaryjnych. Zajęcia dają doskonałą możliwość obserwacji postępowania studentów ze zwierzętami i mogą być pomocne w korygowaniu nieprawidłowych zachowań. Odpowiednio przygotowane zajęcia z gryzoniami laboratoryjnymi stanowią wartościową alternatywę dla ćwiczeń seminaryjnych. Studenci bardzo chętnie podejmują się zarówno bezpośrednich prac ze zwierzętami, jak i czynności związanych z przygotowaniem sprzętu hodowlanego. Zgodnie z opiniami uzyskanymi od studentów, tak prowadzone zajęcia dają lepsze pojęcie o funkcjonowaniu jednostki hodowlanej niż typowe ćwiczenia seminaryjne.

Literatura:

1. Wirth-Dzięciołowska E. Five interacting genes responsible for fur colour in mice
2. Silvers W.K., 1979. The Coat Colors of Mice. A Model for Mammalian Gene Action and Interaction. Nowy Jork, Springer Verlag
3. Popesko P., Rajtova V., Horak J. Atlas anatomii małych zwierząt laboratoryjnych. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśnicze Sp.z.o.o. Warszawa, 335-396.
4. animal.sggw.pl/category/studenci/sylabusy

Laboratory mouse as a model animal in the education process of students of biological and natural science universities

NORBERT DANIEL GAŁKA*, MARTA GAJEWSKA,
WIESŁAW ŚWIDEREK

Warsaw University of Life Sciences, Institute of Animal Sciences,
Department of Animal Genetics and Conservation

*correspondence address: e-mail: norbert_galka@sggw.edu.pl

Keywords: student, education, practice, laboratory mouse

Practical preparation for the profession is an essential element of the education of specialists such as animal technicians, veterinarians, biologists and biotechnologists. The conventional animal house (mouse house) of the Warsaw University of Life Sciences gives students the opportunity to gain practical experience in working with laboratory mice. During their studies, students attend theoretical classes (lectures and seminar exercises) that allow them to acquire basic knowledge about laboratory animals. The second part consists of practical exercises, during when they do basic work related to breeding laboratory mice, as well as work related to the daily functioning of the animal facility. Only mice from a specially bred "for didactic" herd are used in these classes. These animals are characterized by calmer behavior and a lower level of anxiety than typical laboratory mice. An additional advantage of the herd is the morphological diversity in terms of fur color and structure. "Didactic" animals do not participate in experimental procedures. After their "mission" with students, most of these mice are adopted (students and LabRescue foundation). Classes in the facility allow students to become familiar with the practice of an animal-keeping job. The classes are about work organization, health and safety rules, biosecurity, handling animals, preparation of breeding and experimental equipment, creating breeding and experimental documentation. The "didactic" mice is also used for practical learning of the basics genetics – students have the occasion to get to know animals of different colors and types of fur (start to the genetics of qualitative traits), they also take measurements of animals (start to the genetics of quantitative traits). Students can also

participate in animal autopsies. The observations can be the basic for further seminar classes. These classes are excellent occasion to look at students' behaviour towards animals and can be helpful in correcting inappropriate behavior. Properly prepared lab classes provide a valuable alternative to seminar exercises. Students are very involved in direct work with animals, as well as in activities related to the preparation of breeding equipment. In students opinions, classes conducted in this way provide a better understanding of the functioning of a breeding lab than typical seminar exercises.

References:

1. Wirth-Dzięciołowska E. Five interacting genes responsible for fur colour in mice
2. Silvers W.K., 1979. The Coat Colors of Mice. A Model for Mammalian Gene Action and Interaction. Nowy Jork, Springer Verlag
3. Popesko P., Rajtova V., Horak J. Atlas anatomii małych zwierząt laboratoryjnych. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśnicze Sp.z.o.o. Warszawa, 335-396.
4. animal.sggw.pl/category/studenci/sylabusy

Wpływ normalizacji miotów na masę ciała odsadzanej i dorosłej myszy na przykładzie linii ciężkiej i lekkiej

JULIA RĘKAS, NORBERT DANIEL GAŁKA*,
MARTA GAJEWSKA,

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie; Instytut Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

*adres do korespondencji: norbert_galka@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: normalizacja, masa ciała, mysz laboratoryjna,

Metodą często stosowaną w hodowli zwierząt laboratoryjnych jest zmniejszanie miotów, w konsekwencji ujednolicające wyniki, a także dyktowane zasadami ekonomii utrzymania stad. Słuszność tej idei wzbudzała jednak kontrowersje. Badanie oparto na selekcyjnych liniach nie krewniaczych *lekkiej (L)* i *ciężkiej (C)*, hodowanych w SGGW przez ponad 150 pokoleń. Kryterium selekcyjne stanowi masa ciała przy odsadzeniu w 21 dniu życia. Średnia masa odsadzeniowa myszy linii L to 6,69 g a myszy z linii C to 12,24 g. W 5 miesiącu życia zwierzęta osiągają odpowiednio 22,9 i 43,0 gramów. Badano osobniki z pokolenia 151. Kojarzeniu poddano po 50 par, przy czym po sześć najliczniejszych miotów nie poddano normalizacji. W pozostałych pozostawiono 4 osobniki: 2 samice i 2 samce. W badaniu wykorzystano 148 samców i 178 samic L i 165 samców i 165 samic C. Myszy ważono w 21 dniu życia oraz w 5 miesiącu życia. Dane poddano analizie statystycznej. Analiza statystyczna wykazała, że dla zwierząt obu linii różnice w masie ciała w 21 dniu pomiędzy zwierzętami z miotów naturalnych i normalizowanych są wysokoistotne. U zwierząt dorosłych różnice te były widoczne tylko u myszy z linii ciężkiej, szczególnie u samców – masa ciała osobników męskich z miotów normalizowanych przekraczała o 10g średnią masę ciała wyznaczoną dla miotów niezmnieszanych. Może to sugerować, że proces normalizacji przyczynia się do przekarmienia młodych – organizm matki rozpoczął laktację do wykarmienia pełnego miotu. Normalizacja miotów wpływa na masę ciała myszy, jednak jej działanie jest zależne od linii. U myszy z linii L wpływ normalizacji zaniknął w 5 miesiącu życia zwierząt, w linii C stwierdzono długotrwały wpływ normalizacji na masę ciała. W linii L po odsadzeniu następuje kompensacja wzrostu. Zmniejsz-

szanie miotów wpływa na masę ciała myszy w obu liniach, nawet jeśli wpływ normalizacji nie był długotrwały, to w obu liniach osobniki z mniej licznych miotów były cięższe. Drastycznym efektem wpływu normalizacji na masę ciała jest pojawienie się nienaturalnie ciężkich osobników w linii C.

Literatura:

1. Świderek W, Fiszdon K., Góral-Radziszewska K., Sokołowski G. 2014: Wpływ przeciwstawnej selekcji w 21. dniu w kierunku masy ciała na wybrane cechy u myszy laboratoryjnych. Przegląd hodowlany, 3, 24 -25.
2. Tanaka T. 2004: The relationships between litter size, offspring weight, and behavioral development in laboratory mice *Mus musculus*. *Mammal Study*, 29, 147–153.
3. <https://mfiles.pl/pl/index.php/Normalizacja> dostęp: 28.07.2024

The influence of litter normalization on the body weight of weaned and adult mice on the example of the heavy and light lines

JULIA REKAS, NORBERT DANIEL GAŁKA*,
MARTA GAJEWSKA,

Warsaw University of Life Sciences, Institute of Animal Sciences,
Department of Animal Genetics and Conservation

*correspondence address: e-mail: norbert_galka@sggw.edu.pl

Keywords: normalization, body weight, laboratory mouse,

A method often used in the breeding of laboratory animals is the reduction of litters, which allows for standardization of results, as well as dictated by the economics. The validity of this idea is controversial. The experiment was based on selective outbred lines L (light) and C (heavy), bred at Warsaw University of Life Sciences, Institute of Animal Sciences for over 150 generations. The selection criterion is the body weight at weaning on the 21st day of their life. The average weaning weight of the light line mice is 6.69 g and the heavy line mice is 12.24 g. When they are 5 months old, the animals reach 22.9 and 43.0 grams, respectively. Individuals from generation 151 were observed. 50 pairs were mated, with the six largest litters not subjected to normalization. The remaining litters included: 2 females and 2 males. The experiment used 148 males and 178 females light line and 165 males and 165 females heavy line. Mice were weighed on the 21st day of life and at 5 months of age. The data were subjected to statistical analysis. Statistical analysis showed that for animals of both lines, body weight on day 21 between animals from natural and normalized litters is very different. In adult animals, these were visible only in mice from the heavy line, especially in males - the weight of males from normalized litters exceeded the weight of mice from unreduced litters by 10 grams. Presumably that the normalization process contributes to overfeeding of the young – the mothers organisms had started lactation for feed a bigger litter. Normalization of litters affects mouse body weight, but its effect is line dependent. In mice from the light line, the effect of normalization disappeared in the 5th month of life of the animals. In the heavy line a long-term effect of normali-

zation on body weight was observed. In the light line, growth compensation occurs after weaning. Reducing litters affects the body weight of mice in both lines. Even though the effect of normalization was not always long-lasting, individuals from smaller litters were heavier in both lines. A drastic effect of the impact of normalization on body weight is the appearance of unnaturally big individuals in the heavy line.

References:

1. Świderek W, Fiszdon K., Góral-Radziszewska K., Sokołowski G. 2014: Wpływ przeciwstawnej selekcji w 21. dniu w kierunku masy ciała na wybrane cechy u myszy laboratoryjnych. Przegląd hodowlany, 3, 24 -25.
2. Tanaka T. 2004: The relationships between litter size, offspring weight, and behavioral development in laboratory mice *Mus musculus*. *Mammal Study*, 29, 147–153.
3. <https://mfiles.pl/pl/index.php/Normalizacja> dostęp: 28.07.2024

Występowanie problematycznych gatunków żółwi na rynku zoologicznym w Polsce

JAKUB BALTAZAR BADZIUKIEWICZ*, RAFAŁ MACIASZEK,
NORBERT GAŁKA

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Instytut Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt

*adres do korespondencji: e-mail: jakub_badziukiewicz@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: inwazyjny gatunek obcy, żółw ozdobny, akwarystyka, bioróżnorodność

W związku ze wzrostem popularności rynku zwierząt egzotycznych na świecie, obce gatunki żółwi trafiły do handlu także w Polsce. Skutkiem ich zwiększającej się popularności i ograniczonej wiedzy dotyczącej amatorskiego utrzymywania zwierząt egzotycznych, żółwie te były licznie porzucane, przez co obserwować je można w środowisku przyrodniczym. Obecnie w Polsce oprócz rodzimego żółwia błotnego *Emys orbicularis* obserwować można także wiele innych obcych gatunków żółwi. Celem badań było stwierdzenie jakie gatunki żółwi i jak licznie występują na rynku zoologicznym w Polsce oraz wyłonienie z nich gatunków problematycznych, mogących stanowić zagrożenie dla bioróżnorodności i powiązanych usług ekosystemowych. W ramach badań analizowano ich obecność na giełdach zoologicznych, w sklepach zoologicznych oraz w ogłoszeniach zamieszczonych w internecie. Badania zrealizowano w pierwszej połowie 2024 roku i wybrano do tego celu trzy miasta, natomiast informacje z ogłoszeń internetowych dotyczyły całego kraju. Skontrolowano wówczas dwukrotnie trzy giełdy zoologiczne oraz 30 sklepów. Na giełdach stwierdzono obecność 543 osobników żółwi należące do 11 gatunków. Znacząco dominowały żółwie z rodzaju *Pseudemys*, zwyczajowo nazywane żółwiami hieroglifowymi. W sklepach natomiast łącznie zaobserwowano 59 osobników (7 gatunków) – najwięcej było żółwi chińskich *Mauremys reevesii*. Skontrolowano także 167 ogłoszeń internetowych, w których stwierdzono przedstawicieli 3 podgatunków żółwia ozdobnego *Trachemys scripta*, którego przetrzymywanie oraz wprowadzanie do obrotu jest zakazane na podstawie ustawy z dnia 11 sierpnia 2021 r. o gatunkach obcych. Najliczniej obserwowane na rynku zoologicznym gatunki żółwi wodnolądowych obserwowane są

także w środowisku przyrodniczym, co oznacza, że tam ich liczba może się zwiększać w czasie. W przyszłości należy kontynuować badania dotyczące trendu w handlu obcymi gatunkami żółwi, dzięki czemu możliwym będzie ustalenie gatunków problematycznych, które podobnie jak żółw ozdobny mogą być uwalniane do środowiska, gdzie w sprzyjających okolicznościach mogą stanowić zagrożenie dla bioróżnorodności.

Occurrence of problematic turtle species in the pet trade in Poland

JAKUB BALTAZAR BADZIUKIEWICZ*, RAFAŁ MACIASZEK,
NORBERT GAŁKA

Warsaw University of Life Sciences, Institute of Animal Sciences,
Department of Animal Genetics and Conservation

*correspondence address: e-mail: jakub_badziukiewicz@sggw.edu.pl

Keywords: invasive alien species, ornamental turtle, aquaristics, biodiversity

Due to the increasing popularity of the exotic pet trade worldwide, alien turtle species were also traded in Poland. As a result of their growing popularity and limited knowledge regarding the amateur keeping of exotic animals, these turtles were frequently abandoned, making them observable in the natural environment. Currently in Poland, in addition to the native European pond turtle (*Emys orbicularis*), many other alien turtle species can also be observed. The study aimed to determine which turtle species are present and in what numbers in the pet trade in Poland and to identify problematic species that may pose a threat to biodiversity and related ecosystem services. The research analyzed their presence at pet trading exchanges, in pet stores, and in online advertisements, based on which a database was created. The study was conducted in the first half of 2024, selecting three cities for this purpose, while information from online advertisements was collected nationwide. Three pet trading exchanges were inspected twice, and 60 store inspections were conducted, each of the thirty stores was inspected twice. At the pet trading exchanges, 543 individual turtles from 11 species were found, with the *Pseudemys* species, commonly called hieroglyphic turtles, significantly dominating. In stores, a total of 59 individuals from seven species were observed, with the most being Chinese pond turtles (*Mauremys reevesii*). Also, 167 online advertisements were checked, which found representatives of three subspecies of the pond slider (*Trachemys scripta*), whose retention and trade are prohibited under the Polish law on alien species from August 11, 2021. The most frequently observed species in the pet trade are semi-aquatic turtles, which are also observed in the natural environment, indicating that their numbers there might increase

over time. Future research should continue to study the pet trade trends of alien turtle species to identify problematic species that, like the pond slider, might be abandoned into the environment where, under favorable circumstances, they may pose a threat to biodiversity.

Praktyczne aspekty wyprowadzania i hodowli ryb zmodyfikowanych genetycznie

OLGA GEWARTOWSKA^{1*}, MAGDALENA GRAL²,
MAGDALENA GÓRA²

¹ Pracownia Inżynierii Genomu, Międzynarodowy
Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

² Pracownia Hodowli Ryb, Międzynarodowy
Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

*adres do korespondencji: e-mail: ogewartowska@iimcb.gov.pl

Słowa kluczowe: danio pręgowany, Zebrafish, CRISPR/Cas9, modyfikacje genetyczne, szkodliwy fenotyp

W ostatnich latach danio pręgowany (ang. *Danio rerio*, *zebrafish*) stał się istotnym modelem zwierzęcym używanym w badaniach biomedycznych. Jednym z powodów jest fakt, że zarodki danio są relatywnie duże i przezroczyste oraz pozwalają na łatwe modyfikacje genetyczne. Nie można jednak zapominać, że wyprowadzanie nowych, stabilnych linii ryb jest procedurą wymagającą zgody Lokalnej Komisji Etycznej oraz oceny fenotypu nowo wyprowadzonych linii. W przypadku gdy ryby wykazują szkodliwy fenotyp, zgoda jest wymagana również na utrzymanie linii. Ze względu na fakt, że zmodyfikowane linie danio rzadko mogą być utrzymywane w stanie homozygotycznym, niezbędną czynnością hodowlaną jest genotypowanie ryb. Sposób poboru tkanek powinien być dostosowany do stadium rozwojowego zwierzęcia. Zgodnie z naszym doświadczeniem, dla dorosłych osobników pobranie wymazu ze śluzu może być alternatywą dla pobrania fragmentu płetwy (fin clipping).

Practical aspects of generation and breeding of genetically modified zebrafish lines

OLGA GEWARTOWSKA^{1*}, MAGDALENA GRAL²,
MAGDALENA GÓRA²

¹ Genome Engineering Facility, International Institute
of Molecular and Cell Biology in Warsaw

² Zebrafish Facility, International Institute
of Molecular and Cell Biology in Warsaw

*correspondence address: e-mail: ogewartowska@iimcb.gov.pl

Keywords: zebrafish, CRISPR/Cas9, Genetically modified organisms, harmful phenotype

In recent years, zebrafish (*Danio rerio*) has become an important animal model used in biomedical research. One reason for this is that zebrafish embryos are relatively large and transparent and allow for easy genetic modification. However, it should not be forgotten that the generation of new, stable lines of genetically modified fish is a procedure that requires the approval of the Local Ethical Committee and the evaluation of the phenotype of the newly derived lines. If the fish exhibit a harmful phenotype, approval is also required for line maintenance. Genotyping is an essential element of fish breeding as genetically modified danio lines rarely can be maintained in a homozygous state. The tissue collection method should be adapted to the developmental stage of the animal. According to our experience, for adult fish, mucus swab sampling can be an alternative to fin clipping.

Ochrona bioróżnorodności – odpowiedzialność naukowców czy społeczeństwa?

GRZEGORZ GÓRECKI

Mazurskie Centrum Bioróżnorodności i Edukacji “KUMAK”,
im. prof. K. A. Dobrowolskiego Wydział Biologii,
Uniwersytet Warszawski, Urwitałt 1, 11-730 Mikołajki
g.gorecki@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: bioróżnorodność, kryzys klimatyczny, monitoring

W dobie kryzysu klimatycznego, który powoduje m.in. gwałtowne zmiany pogodowe, spodziewać się można wyraźnej odpowiedzi środowiska przyrodniczego na to zjawisko. Zmiany te dotyczą przesuwania się całych zasięgów roślin i zwierząt czy wręcz całych siedlisk. Dotyczy to również zaniku niektórych gatunków, skracania cykli rozwojowych czy pojawiania się nowych gatunków, które mogą stać się gatunkami inwazyjnymi.

Spółeczeństwa powinny być świadome tych zmian, ponieważ dotyczą wszystkich ekosystemów, od pierwotnych po ekosystemy pochodzenia antropogenicznego. Skala tych zmian prawdopodobnie osiągnie taki poziom, że może wywołać kryzys w rolnictwie, kryzys migracyjny co zmusi całe społeczeństwa do zmian społeczno-kulturowych. Gwałtowne zmiany klimatu powodują również dylematy w ochronie bioróżnorodności polegające na podejmowaniu nowego typu decyzji - jak i co chronić. Czy chronić bioróżnorodność znaną nam dotychczas (przed zmianami klimatu) czy uznać, że zmiany są nieuniknione i skupić się na ochronie bioróżnorodności, która będzie w przyszłości. Aby przygotowywać się na te zmiany oraz planować działania, które mogą wyprzedzić skutki i następstwa zmian klimatu należy prowadzić badania naukowe w tym kierunku, oparte na rzetelnych danych.

W przypadku zmian klimatu, które obejmują całą planetę i prawdopodobnie będą miały bardzo długofalowe skutki, dane naukowe powinny być oparte na licznych, wręcz masowych danych zebranych z jak największego obszaru oraz z jak najdłuższego okresu czasu. Tylko takie podejście pozwoli tworzyć najpewniejsze scenariusze zmian, które pozwolą na przeciwdziałanie lub dostosowywanie się do zmian klimatycznych. Dane dotyczące klimatu i ich zmian są zbierane przez systemy monitoringu pogody, który dziś na świecie

jest powszechny i nikt nie kwestionuje jego potrzeby istnienia. Dane dotyczące środowiska przyrodniczego są zbierane w monitoringu środowiskowym. W przeciwieństwie do danych pogodowych, które mogą być w dużej części zbierane automatycznie to dane środowiskowe często wymagają zbierania tradycyjnymi metodami z bezpośrednim zaangażowaniem obserwatora. Aby spełnić warunek zebrania bardzo licznych danych z jak największego obszaru musimy zaangażować duże zespoły osób. Unia Europejska zauważyła ten problem i zobowiązała państwa członkowskie do prowadzenia monitoringu przyrodniczego.

Pracownicy naukowcy stanowią bardzo mały odsetek populacji w społeczeństwie. Dodatkowo w czasach gdy pracownicy naukowcy są rozliczani i oceniani na podstawie publikacji, działalność związana z monitoringiem przyrodniczym nie jest kierunkiem docenianym i popularnym wśród pracowników naukowych. Wszystko to powoduje, że monitoring środowiska oparty na pracownikach naukowych lub służbach stworzonych zawodowo przez Państwo do prowadzenia monitoringu środowiska jest mało efektywny. W Polsce możemy to obserwować w monitoringu przyrodniczym prowadzonym przez Główny Inspektorat Ochrony Środowiska. Zaangażowanie w ten podstawowy monitoring przyrodniczy w skali całej Polski jest kilkaset osób, które prowadzą obserwację z punktu widzenia obecnych zmian za rzadko (najczęściej co 5 lat!) oraz stosunkowo na małą skalę. Powoduje to, że obecnie monitoring przyrodniczy prowadzony jest dla pojedynczych i tzw. rzadkich i ginących gatunków zwierząt i roślin. Jednocześnie wiadomo, że najlepsze wyniki udało by się uzyskać prowadząc monitoring dla całych ekosystemów monitorując całe zespoły zwierząt i roślin w tym tzw. gatunkach pospolite.

Dlatego też jednym z ważniejszych wyzwań w monitoringu przyrodniczym jest opracowanie metody zbierania danych częściej i w większej ilości. Pewnym rozwiązaniem może być nauka obywatelska. Ten innowacyjny kierunek nauki zaczął się szczególnie szybko rozwijać od czasu pandemii, która pokazała możliwości zdalnego zbierania i przekazywania informacji.

Naukowiec drugiej połowy XXI wieku prawdopodobnie nie tylko będzie prowadził własne badania, ale powinien stać się koordynatorem badań, które może prowadzić grupa społeczna. Nauka obywatelska nie tylko pozwoli na zbieranie ogromnych ilości danych, ale tworzy społeczeństwo obywatelskie. Państwo powinno stworzyć mechanizm promujący zaangażowanie ośrodków naukowych czy uczelni wyższych w naukę obywatelską. Jednocześnie fundamentem nauki obywatelskiej jest edukacja i popularyzacja nauki. Elementy te

powodują, że obywatel może być nie tylko jednostką zbierającą suche dane, ale może być świadomym elementem zespołu badawczego. Instytucje naukowe powinny wykorzystywać ruchy społeczne związane z ochroną przyrody do prowadzenia monitoringu przyrodniczego.

W Polsce przykładem tej ścieżki jest Monitoring Ptaków Polski, który jest włączony do monitoringu w ramach GIOŚ. Jest to jedyna grupa zwierząt monitorowana stosunkowo często, a co najważniejsze jest monitorowana w całości, a nie w zakresie wybranych gatunków. Ornitologia udowadnia, że profesjonalny monitoring może być prowadzony przy udziale całego społeczeństwa i przy wykorzystaniu organizacji pozarządowych.

Podsumowując, istnieje ogromna potrzeba prowadzenia monitoringu środowiska w bardziej szczegółowym zakresie niż do tej pory. Wydaje się że najlepszym rozwiązaniem byłoby włączenie w to całego społeczeństwa w ramach nauki obywatelskiej. Pomoc pracowników naukowych jest niezbędna do skoordynowania, ujednolicenia metodyki oraz nadzoru merytorycznego. Państwo powinno wypracować mechanizmy zachęcające do zaangażowania się instytucji naukowych w naukę obywatelską.

Literatura:

1. Dyrektywa 92/43/EWG w sprawie ochrony siedlisk przyrodniczych oraz dzikiej fauny i flory
2. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/147/WE z dnia 30 listopada 2009 r. w sprawie ochrony dzikiego ptactwa
3. Europejskie Stowarzyszenie Nauki Obywatelskiej: <https://www.ecsa.ngo/>
4. Monitoring Ptaków Polskich <https://monitoringptakow.gios.gov.pl/strona-glowna.html>
5. Monitoring gatunków i siedlisk przyrodniczych <https://siedliska.gios.gov.pl/>
6. Monitoring gatunków i siedlisk morskich <https://morskiesiedliska.gios.gov.pl/pl/>
7. Monitoring Lasów Polskich <https://www.gios.gov.pl/monlas/index.html>
8. Europejskie Partnerstwo na rzecz Różnorodności Biologicznej <https://www.biodiversa.eu/>
9. Philip Vaughtner, Jonghwi Park, Nancy Pham. „Engaging Communities for Biodiversity Conservation: Education for Sustainable Development Projects from the Global RCE Network UNU-IAS”, Tokyo, Japan, 2022
10. EU Biodiversity Strategy for 2030 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0380&from=FR>
11. New Biodiversity Alliance for Sustainable Management to Fix Europe’s Threatened Ecosystems: <https://www.csreurope.org/newsbundle-articles/new-biodiversity-alliance-for-sustainable-management-to-fix-europes-threatened-ecosystems>

Biodiversity protection – responsibility of scientists or society?

GRZEGORZ GÓRECKI

University of Warsaw Masurian Centre for Biodiversity Research
and Education, Urwitałt 1, 11-730 Mikołajki
g.gorecki@uw.edu.pl

Keywords: biodiversity, climate crisis, monitoring

In times of climate crisis, which causes, among others effects, sudden weather changes, a clear response from the natural environment to this phenomenon can be expected. These changes concern the shifting of entire ranges of plants and animals, or even entire habitats. This also includes the disappearance of some species, shortening of life cycles or the emergence of new species that may become invasive species.

Societies should be aware of these changes as they affect all ecosystems, from primary to anthropogenic ecosystems. The scale of these changes will probably reach such a level that it may cause an agricultural crisis or a migration crisis, which will force entire societies to undergo socio-cultural changes. Rapid climate change also presents dilemmas in biodiversity protection, involving making new decisions - how and what to protect. Should we protect the biodiversity we know so far (before climate change) or acknowledge that changes are inevitable and focus on protecting the biodiversity of the future?

To prepare for these changes and plan activities that can anticipate the effects and consequences of climate change, scientific research in this direction should be conducted, based on reliable data.

In the case of climate change, which affects the entire planet and is likely to have very long-term impacts, scientific data should be based on extensive, even massive, datasets collected from as wide an area as possible and over as long period of time as possible. Only such an approach will enable us to create the most reliable change scenarios, allowing us to either counteract or adapt to climate change. Data on climate and its changes are collected by weather monitoring systems, which are common in the world today and no one questions the need for their existence. Data on the natural environment are col-

lected in environmental monitoring. Unlike weather data, which can be largely collected automatically, environmental data often requires data collection using traditional methods with the direct involvement of the observer. To meet the requirement of collecting large amounts of data from as large an area as possible, we need to engage large teams of people. The European Union has noticed this problem and has obliged member states to conduct nature monitoring.

Academics constitute a small part of the population. Additionally, at a time when researchers are held accountable and assessed on the basis of publications, activities related to nature monitoring are not appreciated and popular among them. All this means that environmental monitoring based on researchers or services professionally created by the state to conduct environmental monitoring is ineffective. In Poland, we can observe this in nature monitoring conducted by the Chief Inspectorate of Environmental Protection. Several hundred people are involved in this basic nature monitoring throughout Poland, and they conduct observations, from the point of view of current changes, too rarely (usually every 5 years!) and on a relatively small scale. This means that currently nature monitoring is carried out for rare and endangered species of animals and plants. At the same time, it is known that the best results would be achieved by monitoring entire ecosystems by monitoring entire groups of animals and plants, including the so-called common species.

Therefore, one of the most important challenges in nature monitoring is to develop a method for collecting data more frequently and in larger quantities.

Citizen science may provide a solution. This innovative field of science has begun to develop particularly rapidly since the pandemic, which showed the possibilities of remotely collecting and transmitting information. A scientist in the second half of the 21st century will probably not only conduct his own research but should become a coordinator of research that can be conducted by a social group. Citizen science will not only enable the collection of vast amounts of data, but it also creates civil society. The state should create a mechanism to promote the involvement of research centres and universities in citizen science. At the same time, the foundation of citizen science is education and the popularization of science. These elements mean that a citizen can not only be an individual collecting raw data, but can also be a conscious element of a research team. Scientific institutions should use social movements related to nature conservation to conduct nature monitoring.

In Poland, an example of this path is the Polish Bird Monitoring, which is included in monitoring under the Chief Inspectorate of Environmental Protection. This is the only group of animals monitored relatively often, and most importantly, it is monitored as a whole, not just in selected species. Ornithology proves that professional monitoring can be carried out with the participation of the entire society and with the help of non-governmental organizations.

References:

1. Dyrektywa 92/43/EWG w sprawie ochrony siedlisk przyrodniczych oraz dzikiej fauny i flory
2. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/147/WE z dnia 30 listopada 2009 r. w sprawie ochrony dzikiego ptactwa
3. Europejskie Stowarzyszenie Nauki Obywatelskiej: <https://www.ecsa.ngo/>
4. Monitoring Ptaków Polskich <https://monitoringptakow.gios.gov.pl/strona-glowna.html>
5. Monitoring gatunków i siedlisk przyrodniczych <https://siedliska.gios.gov.pl/>
6. Monitoring gatunków i siedlisk morskich <https://morskiesiedliska.gios.gov.pl/pl/>
7. Monitoring Lasów Polskich <https://www.gios.gov.pl/monlas/index.html>
8. Europejskie Partnerstwo na rzecz Różnorodności Biologicznej <https://www.biodiversa.eu/>
9. Philip Vaughter, Jonghwi Park, Nancy Pham. „Engaging Communities for Biodiversity Conservation: Education for Sustainable Development Projects from the Global RCE Network UNU-IAS”, Tokyo, Japan, 2022
10. EU Biodiversity Strategy for 2030 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0380&from=FR>
11. New Biodiversity Alliance for Sustainable Management to Fix Europe’s Threatened Ecosystems: <https://www.csreurope.org/newsbundle-articles/new-biodiversity-alliance-for-sustainable-management-to-fix-europes-threatened-ecosystems>

Aktualny status projektu OECD dotyczącego zintegrowanego podejścia do badań i oceny toksyczności ostrej dla ryb (IATA)

KATARZYNA GRUSZKA^{1*}, INGA MRZYK¹, JUSTYNA FARON¹

¹ Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Organicznego Oddział w Pszczynie

*adres do korespondencji: katarzyna.gruszka@ipo.lukasiewicz.gov.pl

Słowa kluczowe: metody alternatywne, badanie toksyczności ostrej dla ryb

Badanie toksyczności ostrej dla ryb (AFT, OECD 203, 2019) jest często stosowane i szeroko uwzględniane w ocenie zagrożeń i ryzyka dla środowiska na całym świecie [1]. Celem badania jest ustalenie zależności pomiędzy stężeniem a szkodliwym skutkiem i wyznaczenie stężenia powodującego 50% śmiertelności badanej populacji ryb (LC50) po 96 h narażania, a także określenie innych objawów toksycznego działania materiału badanego. Metoda ta jest uważana za jedną z najsurowszych procedur naukowych. Z biegiem lat dyskusje w Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) zaowocowały zmianami w teście, które zmniejszają liczbę wykorzystywanych ryb. Dostępne są alternatywne metody badawcze (OECD 236, 2013; OECD 249, 2021), ale nie są one powszechnie akceptowane przez organy regulacyjne.

Stale prowadzone są prace nad metodami alternatywnymi dla toksyczności ostrej ryb. Utworzono bazę danych dotyczącą testów na glonach (OECD 201, 2006), rozwiłtkach (OECD 202, 2004), ostrej toksyczności dla ryb oraz testów na zarodkach ryb (FET) w celu oceny przydatności i możliwości zastosowania testu FET w kontekście podejścia progowego [2]. Dodatkowo testy cytotoxyczności na liniach komórkowych ryb (OECD 249) są dobrym podejściem wstępnym do badania przesiewowego AFT [3]. W podejściu progowym najpierw ocenia się toksyczność dla linii komórkowych oraz glonów i rozwiłtek, a następnie przeprowadza się badanie graniczne przy niższej z 2 wartości toksyczności z wykorzystaniem ryb. Jeśli wskazana jest potencjalna toksyczność dla ryb, przeprowadzany jest pełny test mediany stężenia śmiertelnego. Ta wielopoziomowa strategia testowania może znacznie zmniejszyć liczbę ryb wykorzystywanych w testach toksyczności.

Trwają projekty mające na celu wspieranie stosowania alternatywnych podejść (SWiFT), jednak wyznaczenie LC50 zgodnie z metodyką OECD 203 są nadal wymagane [4].

W niniejszej pracy zostanie przedstawiony aktualny stan wiedzy na temat strategii postępowania w ramach zintegrowanego podejścia do badań i oceny ostrej toksyczności dla ryb.

Literatura:

- [1] OECD (2019b). Test Guideline No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing. OECD Test Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. doi:10.1787/9789264069961-en.
- [2] Jane M Rawlings, Scott E Belanger, Kristin A Connors, Gregory J Carr: Fish embryo tests and acute fish toxicity tests are interchangeable in the application of the threshold approach. *Environ Toxicol Chem.* 2019 Mar;38(3):671-681. doi: 10.1002/etc.4351. Epub 2019 Feb 13.
- [3] D Hernández-Moreno, M Blázquez,, JM Navas , ML Fernández-Cruz: Fish cell lines as screening tools to predict acute toxicity to fish of biocidal active substances and their relevant environmental metabolites. *Aquatic Toxicology Volume 242*, January 2022, 106020
- [4] SWiFT project: <https://swift.hugin.com/>

Current status of the OECD project on Integrated Approach to Testing and Assessment of acute toxicity in fish (IATA)

KATARZYNA GRUSZKA^{1*}, INGA MRZYK¹, JUSTYNA FARON¹

¹Lukasiewicz Research Network – Institute of Industrial
Organic Chemistry Branch Pszczyna

*correspondence address: katarzyna.gruszka@ipo.lukasiewicz.gov.pl

Keywords: alternative methods, fish acute toxicity

The fish acute toxicity test (AFT, OECD 203; 2019) is frequently used widely considered in the assessment of environmental hazards and risks worldwide. The aim of the study is to establish a concentration-response relationship, and to determine the concentration causing 50% mortality in the test fish population (LC₅₀) after 96 hours of exposure, as well as to determine other signs of toxic effects of the test material. This method is considered one of the most rigorous scientific procedures. Over the years, discussions at the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) have resulted in changes to the test which reduce the number of fish used. Alternative approaches are available (OECD 236; OECD 249) but they are not widely accepted by regulatory authorities.

Work on alternative methods for AFT is ongoing. A database was compiled for algal OECD 201, for *Daphnia magna* OECD 202, for AFT, and for the fish embryo toxicity (FET) to assess the suitability and applicability of the FET test in a threshold approach context [2]. In addition, cytotoxicity tests on fish cell lines (OECD 249) are a good initial approach to screen for AFT [3]. In the threshold approach, fish cell lines, algal and *Daphnia* toxicity are assessed first, after which a limit test is conducted at the lower of the 2 toxicity values using fish. If potential toxicity in fish is indicated, a full median lethal concentration assay is performed. This tiered testing strategy can significantly reduce the number of fish used in toxicity testing.

There are ongoing projects that aim to support the use of alternative approaches (SWiFT) however in the meantime LC₅₀ determinations using OECD 203 are still required [4].

This paper will present the current state of knowledge on management strategies for an integrated approach to testing and AFT assessment.

References:

- [1] OECD (2019b). Test Guideline No. 203: Fish, Acute Toxicity Testing. OECD Test Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. doi:10.1787/9789264069961-en.
- [2] Jane M Rawlings, Scott E Belanger, Kristin A Connors, Gregory J Carr: Fish embryo tests and acute fish toxicity tests are interchangeable in the application of the threshold approach. *Environ Toxicol Chem.* 2019 Mar;38(3):671-681. doi: 10.1002/etc.4351. Epub 2019 Feb 13.
- [3] D Hernández-Moreno, M Blázquez,, JM Navas , ML Fernández-Cruz: Fish cell lines as screening tools to predict acute toxicity to fish of biocidal active substances and their relevant environmental metabolites. *Aquatic Toxicology Volume 242*, January 2022, 106020
- [4] SWIFT project: <https://swift.hugin.com/>

Pektyna, inulina i psyllium łagodzą hamujący wpływ nanocząstek miedzi na procesy fermentacyjne w kale szczura

KATARZYNA JAWORSKA^{1*}, KATARZYNA OGNIK²,
BARTOSZ FOTSCHKI¹, JOANNA FOTSCHKI¹,
ALEKSANDRA MARZEC², PRZEMYSŁAW ZDUŃCZYK¹,
ANNA STĘPNIOWSKA², EWELINA CHOLEWIŃSKA²,
ŁUCJA BRZUZAN¹, JERZY JUŚKIEWICZ¹

¹ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,

Polska Akademia Nauk, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Polska

² Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Katedra Biochemii i Toksykologii,

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Polska

*adres do korespondencji: email: k.jaworska@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: nanocząstki miedzi, błonnik pokarmowy, enzymy bakteryjne, lotne kwasy tłuszczowe, szczury

Wstęp

Wcześniejsze badania przeprowadzone na żywych organizmach wykazały, że włączenie nanocząstek miedzi do diety hamowało aktywność enzymatyczną i metaboliczną mikrobioty jelita ślepego / kału, prowadząc do zakłócenia prawidłowego funkcjonowania dolnego odcinka przewodu pokarmowego [1]. Obecne badanie miało na celu zweryfikowanie hipotezy, że dodanie do diety błonnika o właściwościach funkcjonalnych przeciwdziałałoby negatywnemu wpływowi nanocząstek miedzi (Cu-NP) na aktywność metaboliczną drobnoustrojów w kale.

Metody

W 6-tygodniowym badaniu żywieniowym szczurom laboratoryjnym Wistar podawano dietę uzupełnioną dwiema dawkami nanocząstek miedzi (zalecana dawka 6,5 mg/kg lub dawka podwojona), a także cztery źródła błonnika o różnych właściwościach: kontrolną celulozę i eksperymentalne (pektyna, inulina lub psyllium). Badanie obejmowało analizę aktywności enzymów bakteryjnych i produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LKT) w wydalanym kale zbieranym przez kolejne dni karmienia.

Wyniki

Włączenie Cu-NP do diety, szczególnie w wyższej testowanej dawce, doprowadziło do znacznego obniżenia aktywności enzymatycznej mikrobioty w kale szczurów już po jednym dniu karmienia. Wprowadzenie błonnika funkcjonalnego do diet zawierających nanocząsteczki miedzi znacznie zwiększyło aktywność enzymów bakteryjnych i produkcję LKT w porównaniu do diet z Cu-NP i kontrolną celulozą. Efekt był najbardziej widoczny w przypadku pektyny, podczas gdy wpływ dodatku inuliny lub psyllium przewyższał efekt pektyny w niektórych przypadkach, takich jak aktywność α -glukozydazy oraz stężenie propionianu i maślanu. Dodatek psyllium był najbardziej skutecznym w zmniejszeniu tworzenia amoniaku w kale.

Podsumowanie

Błonnik pokarmowy, taki jak pektyna, inulina lub psyllium, odgrywa kluczową rolę w regulacji hamującego wpływu nanocząstek miedzi na procesy fermentacyjne drobnoustrojów jelitowych.

Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Grant nr 2021/41/B/NZ9/01104.

Literatura:

- [1] Cholewińska E, Ognik K, Fotschki B, Zduńczyk Z, Juśkiewicz J. Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS One*. 2018;13:e0197083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197083>.

Dietary pectin, inulin and psyllium mitigate the inhibitory effects of copper nanoparticles on fecal fermentation processes in rats

KATARZYNA JAWORSKA^{1*}, KATARZYNA OGNIK²,
BARTOSZ FOTSCHKI¹, JOANNA FOTSCHKI¹,
ALEKSANDRA MARZEC², PRZEMYSŁAW ZDUŃCZYK¹,
ANNA STĘPNIOWSKA², EWELINA CHOLEWIŃSKA²,
ŁUCJA BRZUZAN¹, JERZY JUŚKIEWICZ¹

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research,

Polish Academy of Sciences, Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland

² Department of Biochemistry and Toxicology, Faculty of Animal Sciences
and Bioeconomy, University of Life Sciences, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

*correspondence address: e-mail: k.jaworska@pan.olsztyn.pl

Keywords: copper nanoparticles, dietary fiber, microbial enzymes, short-chain fatty acids, rats

Background

Prior research conducted in living organisms has indicated that including copper nanoparticles in the diet suppressed the enzymatic and metabolic activity of cecal/fecal microbiota, leading to disruption in the proper functioning of the lower digestive tract [1]. The current study sought to investigate the theory that adding fiber with functional properties to the diet would counteract the negative effects of copper nanoparticles (Cu-NP) on fecal microbial metabolic activity.

Methods

In a 6-week feeding study, Wistar laboratory rats were provided with diets supplemented with two doses of copper nanoparticles (either the recommended dose of 6.5 mg/kg or a doubled dose), as well as four sources of fiber with different properties: control (cellulose) and experimental (pectin, inulin, and psyllium). The study involved analyzing the activity of bacterial enzymes and the production of short-chain fatty acids (SCFA) in the excreted feces collected over consecutive days of feeding.

Results

The incorporation of Cu-NP into the diet, particularly at the higher dose tested, led to a significant and swift decrease in the enzymatic activity of the microbiota in the rats' feces after just one day of feeding. The introduction of functional fiber into diets containing copper nanoparticles notably boosted bacterial enzyme activity and SCFA production compared to diets with nanoparticles and standard cellulose. This effect was most pronounced and rapidly observable with pectin, while the impact of adding inulin or psyllium surpassed that of pectin in certain instances, such as α -glucosidase activity and propionate and butyrate concentration. Dietary psyllium was most effective in reducing fecal ammonia formation.

Conclusion

To summarize, dietary fiber, such as pectin, inulin, or psyllium, plays a crucial role in regulating the inhibitory effect of copper nanoparticles on the intestinal microbial fermentative processes.

This work was financed by the National Science Centre, Grant No. 2021/41/B/NZ9/01104.

References:

- [1] Cholewińska E, Ognik K, Fotschki B, Zduńczyk Z, Juśkiewicz J. Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS One*. 2018;13:e0197083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197083>.

Ból u zwierząt w zoo

MIROŚLAW KALICKI

Gdański Ogród Zoologiczny
adres do korespondencji: e-mail: mkalicki@zoo.gda.pl

Słowa kluczowe: zwierzęta zoologiczne, ból

Osoby odpowiadające za ogrody zoologiczne za swój główny cel uznają za pewnienie eksponowanym zwierzętom najwyższych standardów dobrostanu. Pomimo tego, że zwierzętom zapewnia się dobrej jakości pożywienie, eliminuje się zagrożenia ze strony drapieżników, praktycznie nie występują skrajne, niesprzyjające czynniki atmosferyczne, to sam fakt utrzymywania w zamknięciu może powodować niepożądane sytuacje skutkujące bolesnymi urazami. Jednakże najczęstszym powodem bólu u zwierząt w zoo są zmiany chorobowe wywołane podeszłym wiekiem. Zwierzęta w ogrodach zoologicznych żyją zwykle znacznie dłużej niż na wolności, co znacznie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych (1). Niestety długotrwałe, leczenie przewlekłego bólu może być związane z ryzykiem wystąpienia niepożądanych skutków zdrowotnych. Z własnej praktyki znany jest przypadek wystąpienia perforacji ściany okrężnicy u słonicy afrykańskiej leczonej przez kilka lat podawanymi doustnie niesterydowymi lekami przeciwbólowymi i przeciwzapalnymi.

Lekarz weterynarii leczący zwierzęta w zoo powinien sam umieć wnikliwie obserwować swoich podopiecznych, lecz bardzo często musi mieć dodatkowe wsparcie w osobach bezpośrednio opiekujących się zwierzętami. Utrzymywane w zoo zwierzęta znają lekarza weterynarii i zwykle reagują strachem na jego widok. Nie zawsze jest zatem możliwe aby lekarz osobiście był w stanie zaobserwować mniej intensywne objawy bólowe, gdyż zwierzęta w sytuacjach stresowych unikają okazywania słabości. Osobniki, które wcześniej były leczone postrzegają lekarza jako źródło stresu, lub nawet bólu, gdyż niektóre interwencje lekarskie związane są z wykonywaniem iniekcji albo poskramianiem fizycznym lub farmakologicznym. Im zwierzę jest inteligentniejsze, tym trudniej lekarzowi weterynarii zbliżyć się niepostrzeżenie do zwierząt i zaobserwować zmiany. Nieprawidłowe zachowanie może być efektem zaburzenia dobrostanu powodowanym przez czynniki środowiskowe (2), może też być

wywołane toczącym się procesem chorobowym związanym z wystąpieniem reakcji bólowej. Decyzja o interwencji lekarskiej w zoo powinna być więc podejmowana wspólnie przez lekarza weterynarii i znającą behavior danego gatunku osobę odpowiedzialną za utrzymanie w warunkach dobrostanu.

Literatura:

1. Bacon, H. (2023). Pain: Physiology, Recognition, and Management in Zoo Animals. In: Brando, S., Chapman, S. (eds) *Optimal Wellbeing of Ageing Wild Animals in Human Care*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-30659-4_9
2. Lutz, C. K., & Baker, K. C. (2023). Using behavior to assess primate welfare. In L. M. Robinson & A. Weiss (Eds.), *Nonhuman primate welfare: From history, science, and ethics to practice* (pp. 171–205). Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82708-3_8

Pain in zoo animals

MIROŚLAW KALICKI

Gdańsk Zoological Garden

correspondence address: e-mail: mkalicki@zoo.gda.pl

Key words: zoo animals, pain

Those in charge of zoos consider it their primary objective to ensure the highest welfare standards for the animals on display. Despite the fact that the animals are provided with good-quality food, the dangers of predators are eliminated and there are virtually no extremes of adverse weather conditions, the very fact of confinement can cause undesirable situations resulting in painful injuries. However, the most common cause of pain in zoo animals is lesions caused by old age. Animals in zoos tend to live much longer than in the wild, which significantly increases the likelihood of advanced degenerative changes (1). Unfortunately, long-term, chronic pain management can be associated with the risk of adverse health effects. From my own practice, I am aware of a case of colonic wall perforation in an African elephant treated for several years with orally administered non-steroidal analgesics and anti-inflammatory drugs.

A veterinarian treating animals in a zoo should himself be able to closely observe his charges, but very often he must have additional support in the people directly caring for the animals. The animals kept in the zoo know the vet and usually react with fear when they see him. It is therefore not always possible for the vet to personally observe less intense pain symptoms, as animals in stressful situations avoid showing weakness. Individuals that have previously been treated perceive the doctor as a source of stress, or even pain, as some medical interventions involve injections or physical or pharmacological taming. The more intelligent the animal is, the more difficult it is for the veterinarian to approach the animals unnoticed and observe changes. Abnormal behaviour may be the result of a welfare disorder caused by environmental factors (2), or it may be caused by an ongoing disease process associated with a pain response. The decision to medically intervene with a pet animal should therefore be made jointly by the veterinarian and the person in charge of the animal's behaviour under welfare conditions, who is familiar with the species' behaviour.

References:

1. Bacon, H. (2023). Pain: Physiology, Recognition, and Management in Zoo Animals. In: Brando, S., Chapman, S. (eds) *Optimal Wellbeing of Ageing Wild Animals in Human Care*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-30659-4_9
2. Lutz, C. K., & Baker, K. C. (2023). Using behavior to assess primate welfare. In L. M. Robinson & A. Weiss (Eds.), *Nonhuman primate welfare: From history, science, and ethics to practice* (pp. 171–205). Springer Nature Switzerland AG. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82708-3_8

Udoskonalenie klatek metabolicznych dla gryzoni

URSZULA KARZMARCZYK^{1*}, EWA LASZUK¹,
MILENA WÓJCICKA¹, MAGDALENA FRĄCZYK¹,
PIOTR GARNUSZEK¹

¹ Narodowe Centrum Badań Jądrowych, Ośrodek Radioizotopów POLATOM,
ul. Andrzeja Sołtana 7, 05-400 Otwock, Poland

*adres do korespondencji: e-mail: urszula.karczmarczyk@polatom.pl

Słowa kluczowe: 3R's, klatki metaboliczne, udoskonalenie, myszy, szczury

Wychodząc naprzeciw kontrowersjom związanym z przetrzymywaniem gryzoni w klatkach metabolicznych, które są nieodzownym elementem badań metabolizmu, farmakokinetyki, badań żywieniowych i badań nad otyłością i cukrzycą proponujemy innowacyjne rozwiązanie techniczne w budowie standardowej klatki metabolicznej.

Ze względu na główne przeznaczenie jakie mają klatki metaboliczne, czyli oddzielenie kału od moczu w celu pozyskania niezanieczyszczonej próbki, niemożliwa jest zmiana konstrukcji samej klatki. Nie możliwe jest również wprowadzenie materiału gniazdowego i wzbogacenia, które w szczególności mogłyby zaburzać zbiórkę moczy, analizy metabolitów, a w przypadku leków radioizotopowych pomiar wydalonej aktywności badanych radiofarmaceutyków. Nie mniej, istnieją doniesienia literaturowe o stosowaniu udoskonalenia w postaci dodatkowych półek [1], szklanego lub metalowego wzbogacenia.

Uwzględniając dichromatyczne widzenie u gryzoni proponujemy zbudowanie klatki metabolicznej, w której część ścianki bocznej oraz przykrywkę będą w kolorze czerwonym, co spowoduje, iż zwierzę poczuje się „schowane” i bezpieczne. Zaproponowane rozwiązanie jest zastosowaniem jednej z zasad 3R, a mianowicie udoskonalenie, w tym przypadku, udoskonalenie warunków bytowych gryzoni.

Aby sprawdzić czy nasza propozycja w rzeczywistości poprawia dobrostan zwierząt, poszukujemy partnera, który dysponuje aparaturą do monitoringu zachowania zwierząt np.: kamerą do obrazowania termicznego, którą można by zastosować jako jeden z parametrów pomiarowych dobrostanu zwierząt.

Literatura:

- [1] Wittek, L.; Touma, C.; Nitezki, T.; Laeger, T.; Krämer, S.; Raila, J. Reduction in Cold Stress in an Innovative Metabolic Cage Housing System Increases Animal Welfare in Laboratory Mice. *Animals* 2023, *13*, 2866. <https://doi.org/10.3390/ani13182866>

Metabolic cage improvement for rodents

URSZULA KARCZMARCZYK^{1*}, EWA LASZUK¹,
MILENA WÓJCICKA¹, MAGDALENA FRĄCZYK¹,
PIOTR GARNUSZEK¹

¹ Narodowe Centrum Badań Jądrowych, Ośrodek Radioizotopów POLATOM,
ul. Andrzeja Sołtana 7, 05-400 Otwock, Poland

* adres do korespondencji: e-mail: urszula.karczmarczyk@polatom.pl

Keywords: 3R's, metabolic cage, enhancement, mice, rats

To address the controversy over the confinement of rodents in metabolic cages, which is indispensable for metabolic studies, pharmacokinetics, nutritional studies, and obesity and diabetes research, we propose an innovative technical solution for building a standard metabolic cage.

Because metabolic cages must separate feces from urine to obtain an uncontaminated sample, it is impossible to change the design of the cage itself. It is also not possible to introduce nesting material and enrichment, which, in particular, could interfere with urine collection, metabolite analysis and, in the case of radioisotopic drugs, measurement of the excreted activity of the radiopharmaceuticals under study. However, there are reports in the literature on the use of enhancement in the form of additional shelves [1], glass, or metal enrichment.

Considering the dichromatic vision of rodents, we propose to build a metabolic cage in which part of the side wall and the lid will be red, which will make the animal feel “hidden” and safe. The proposed solution applies one of the principles of the 3Rs, namely, improvement, in this case, improvement of rodents' living conditions.

To test whether our proposal actually improves animal welfare, we are looking for a partner who has an apparatus for monitoring animal behaviour, for example, a thermal imaging camera, which could be used as one of the parameters for measuring animal welfare.

References:

- [1] Wittek, L.; Touma, C.; Nitezki, T.; Laeger, T.; Krämer, S.; Raila, J. Reduction in Cold Stress in an Innovative Metabolic Cage Housing System Increases Animal Welfare in Laboratory Mice. *Animals* 2023, *13*, 2866. <https://doi.org/10.3390/ani13182866>

Aspekty prawne relacji wnioskodawców z lokalnymi komisjami etycznymi ds. doświadczeń na zwierzętach. Wnioskowanie o udzielenie zgody na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach.

JUSTYNA KNOSAŁA, MAGDALENA AKOLIŃSKA

Krajowa Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach

*adres do korespondencji: justyna.knosala@mnisw.gov.pl

Słowa kluczowe:

W trakcie wystąpienia zostaną przybliżone prawne podstawy działania lokalnych komisji etycznych ds. doświadczeń na zwierzętach. Szczególnie uwzględnione zostaną te regulacje procedury administracyjnej, które w najistotniejszy sposób kształtują sytuację prawną (a także faktyczną) podmiotów ubiegających się o udzielenie zgody na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach. Celem wystąpienia jest zaprezentowanie trudności oraz wyzwań związanych ze stosowaniem wymogów Kodeksu postępowania administracyjnego w działaniu komisji etycznych, jak również związanych z tym konsekwencji dla wnioskodawców.

Legal aspects of applicants' relations with local committees for ethics in animal research. Applying for permission to conduct an experiment on animals.

JUSTYNA KNOSAŁA, MAGDALENA AKOLIŃSKA

Polish National Committee for Ethics in Animal Research

*adres do korespondencji: justyna.knosala@mnisw.gov.pl

Zwierzęta wolno żyjące w badaniach naukowych – meta-analiza obszarów badawczych

ANNA DIANA KONONIUK^{1*}, ANNA KORZEKWA¹

¹Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,
Zespół Ochrony Bioróżnorodności, Popielno 25, 12-220 Ruciane-Nida

*e-mail: a.kononiuk@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: zwierzęta wolnożyjące, przegląd danych, analiza obszarów badawczych

Badania nad zwierzętami wolnożyjącymi w dużej mierze wykonywane są w ramach zarządzania populacją zwierząt, w celu ochrony gatunku czy monitorowania kondycji populacji, przynoszą one cenne informacje w kwestii ochrony przyrody. W Polsce występuje 109 gatunków ssaków wolno żyjących (IOP PAN Kraków) reprezentujących 61 rodzajów zwierząt, zaliczanych do 25 rodzin. W ciągu ostatnich 10 lat (2014-2024) w światowej literaturze naukowej ukazało się około 739614 opracowań ich dotyczących (stan na 28.06.2024). Celem niniejszego opracowania jest analiza dostępnych danych w celu określenia głównych nurtów badań nad zwierzętami dziko żyjącymi w Polsce.

Przeprowadzono analizę publikacji dostępnych w popularnych bazach danych (Google Scholar, Scopus i Web of Science). W pierwszym etapie przeszukiwano tytuły publikacji, słowa kluczowe oraz streszczenia artykułów opublikowanych w latach 2014 – 2024 w poszczególnych bazach danych. Na tej podstawie wytypowano 3 najliczniejsze pod względem opublikowanych prac rzędy oraz rodzaje zwierząt. Dla każdego gatunku występującego na terytorium Polski zaliczanego do najliczniej opisywanych w literaturze rodzajów zwierząt, przeprowadzono szczegółową analizę w celu określenia obszaru badań, kategorii badań, typu publikacji, kraju pochodzenia autorów oraz celu badań.

Najliczniej opisywanymi rzędami są zwierzęta drapieżne, gryzonie i parzystokopytne z zakresu których publikacje stanowią odpowiednio 32%, 26% i 25% wszystkich dostępnych opracowań dla ssaków wolno żyjących w Polsce. Najliczniej opisywanymi rodzajami zwierząt zaliczanymi do wybranych rzędów są wilk (*Canis*), lis (*Vulpes*), ryś (*Lynx*), bóbr (*Castor*), nornik (*Microtus*), myszarka (*Apodemus*) oraz jeleń (*Cervus*), daniel (*Dama*), świnia (*Sus*). W Polsce występuje 19 gatunków zwierząt zaliczanych do wyżej wymienionych rodza-

jów, dla których przeprowadzono szczegółową meta-analizę danych zawartych w publikacjach. Najliczniej uwzględnianym w publikacjach ssakiem wolno żyjącym w Polsce jest dzik (*Sus scrofa*) – w ciągu ostatnich 10 lat uwzględniony w 4610 opracowaniach naukowych (wg. Bazy Web of Science), które najliczniej obejmowały dziedziny nauk weterynaryjnych (22,8%), zoologii (14,72%) oraz ekologii (14,21%). Krajem dominującym w badaniach dotyczących dzików są Stany Zjednoczone (22,5%), Włochy (10,8%) oraz Hiszpania (9,41%). Najmniej publikacji uwzględniało badania dotyczące nornika darniowego (*Microtus subterraneus*) – 28 opracowań z zakresu zoologii (6 opracowań), biologii oraz parazytologii (po 5 opracowań).

Wild animals in scientific research – meta-analysis of research areas

ANNA DIANA KONONIUK^{1*}, ANNA KORZEKWA¹

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research
Polish Academy of Sciences in Olsztyn,
Biodiversity Protection Scientific Group, Popielno 25, 12-220 Ruciane-Nida

*e-mail: a.kononiuk@pan.olsztyn.pl

Keywords: wild animals, data review, research area analysis

Research on wild animals is largely carried out in the framework of animal population management, to protect the species or monitor the condition of the population, they bring valuable information on the nature conservation. In Poland, there are 109 species of wild mammals (IOP PAN Krakow), representing 61 genera of animals, in 25 families. Over the past 10 years (2014-2024), about 739614 studies on them have been published in the world scientific literature (as of 28.06.2024). The purpose of this study is to analyze the available data to identify the main research trends on wildlife animals in Poland.

An analysis of publications available in popular databases (Google Scholar, Scopus, and Web of Science) was conducted. In the first stage, the titles of publications, keywords, and abstracts were searched in articles published between 2014 and 2024 in each database. On this basis, the 3 most numerous orders and types of animals in terms of published papers were selected. For each species occurring within Poland, counted among the most numerous types of animals described in the literature, a detailed analysis was carried out to determine the area of research, research category, type of publication, and country of origin of the authors and the purpose of the research.

The most abundantly described orders are carnivores, rodents, and artiodactyla of which publications account for 32%, 26%, and 25%, respectively, of the total available studies for wild mammals in Poland. The most described types of animals included in the selected orders are wolf (*Canis*), fox (*Vulpes*), lynx (*Lynx*), beaver (*Castor*), vole (*Microtus*), apodemus (*Apodemus*), and deer (*Cervus*), fallow deer (*Dama*), pig (*Sus*). In Poland, there are 19 species of animals included in the above-mentioned genera, for which a detailed meta-analysis of the

data contained in the publications was carried out. The wild boar (*Sus scrofa*) is the most widely included wild mammal in publications, having been included in 4610 scientific papers over the past 10 years (according to the Web of Science database), with the largest numbers in the fields of veterinary science (22.8%), zoology (14.72%) and ecology (14.21%). The dominant country in wild boar research is the United States (22.5%), Italy (10.8%) and Spain (9.41%). The least number of publications included studies on the turf vole (*Microtus subterraneus*) - 28 studies on the fields of zoology (6 studies), biology and parasitology (5 studies each).

Systemy obrazowania IVIS® – legendarna wydajność obrazowania optycznego *in vivo*

RONALD KOOP¹*

¹Revvity (Germany) GmbH

Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg, Germany

* adres do korespondencji: e-mail: Ronald.Koop@revvity.com

Słowa kluczowe: obrazowanie przedkliniczne, obrazowanie *in vivo*, bioluminescencja, fluorescencja, mikroCT

Obrazowanie optyczne *in vivo* to monitorowanie sygnałów optycznych, takich jak bioluminescencja lub fluorescencja u żywych zwierząt. Jest to wszechstronna technologia monitorowania odpowiedzi komórkowych i molekularnych mechanizmów chorób *in vivo*. Jest ono szczególnie przydatne do śledzenia komórek, bakterii i wirusów *in vivo* oraz pomaga określić molekularne mechanizmy chorób za pomocą innowacyjnych sond fluorescencyjnych i transgenicznych zwierząt wytwarzających światło.

Systemy IVIS® to oryginalne instrumenty opracowane do obrazowania optycznego *in vivo* będące wiodącą marką na świecie z innowacyjnymi funkcjami, takimi jak rekonstrukcja 3D sygnałów bioluminescencyjnych i fluorescencyjnych.

Podczas warsztatów zademonstrujemy, jak wykorzystać te systemy w badaniach na zwierzętach, w tym w postępowaniu ze zwierzętami, gromadzeniu i analizie danych. Wyjaśnione zostaną zaawansowane funkcje, takie jak obrazowanie tomograficzne i multipleksowanie sygnału poprzez opatentowany algorytm Spectral Unmixing.

Przykładowe filmy wideo przedstawiające działanie systemu zostaną połączone z analizą danych na żywo w celu zademonstrowania funkcjonalności systemów IVIS.

Podczas warsztatów gorąco zachęcamy do zadawania pytań i dyskusji!

The IVIS® imaging systems – legendary performance for optical imaging *in vivo*

RONALD KOOP¹*

¹ Revvity (Germany) GmbH

Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg, Germany

*correspondence address: e-mail: Ronald.Koop@revvity.com

Keywords: preclinical imaging, *in vivo* imaging, bioluminescence, fluorescence, microCT

In vivo optical imaging refers to monitoring optical signals, like bioluminescence or fluorescence in living animals. It is a versatile technology to monitor cellular responses and molecular mechanisms of disease *in vivo*. It is especially useful for tracking cells, bacteria and viruses *in vivo*, and it helps to determine molecular disease mechanisms with innovative fluorescent probes and transgenic, light-producing animals.

The IVIS® systems are the original instruments developed for *in vivo* optical imaging and are the leading brand worldwide with innovative functions like 3D reconstruction of bioluminescent and fluorescent signals.

This workshop will demonstrate how to use these systems in animal research, including animal handling, data acquisition and analysis. Advanced functions like tomographic imaging and signal multiplexing through Spectral Unmixing will be explained.

Illustrative videos of system operation will be combined with live data analysis to demonstrate the functionality of the IVIS systems.

Questions and discussions are highly encouraged throughout the workshop!

Obrazowanie przedkliniczne — wszechstronna technologia monitorowania odpowiedzi komórkowych i molekularnych mechanizmów choroby *in vivo*.

RONALD KOOP¹*

¹Revvity (Germany) GmbH

Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg, Germany

* adres do korespondencji: e-mail: Ronald.Koop@revvity.com

Słowa kluczowe: obrazowanie przedkliniczne, obrazowanie *in vivo*, bioluminescencja, fluorescencja, USG, mikroCT

Omówionych zostanie kilka ważnych technologii obrazowania przedklinicznego małych zwierząt, takich jak obrazowanie optyczne, ultrasonograficzne i μ CT, a także omówione zostaną przykłady ich zastosowań.

Obrazowanie optyczne to wyjątkowo wszechstronna technologia umożliwiająca śledzenie komórek, bakterii i wirusów *in vivo* oraz określanie molekularnych mechanizmów chorób, takich jak m.in. zapalenia i apoptoza.

Ultrasonografia bazująca na ultradźwiękach to uznana technologia obrazowania małych zwierząt. Zaprezentujemy nowatorski system, który nie wymaga ręcznej sondy ultradźwiękowej. Został on specjalnie zaprojektowany do szybkiego obrazowania wielu zwierząt z wysoką powtarzalnością, niezależną od użytkownika. System ten jest zoptymalizowany np. do pomiaru wielkości guza i posiada specjalny moduł pozwalający określić stopień zwłóknienia tkanki.

Zastosowania obrazowania μ CT obejmują obrazowanie kości, układu sercowo-naczyniowego oraz obrazowanie o najwyższej rozdzielczości po precyzyjną lokalizację poruszających się obiektów. Zaprezentujemy niezwykle wszechstronny instrument, który mierzy kości małych myszy i zwierząt aż do rozmiarów królików, generuje obrazy o wysokiej rozdzielczości struktur bełeczkowych w kościach myszy, a także obrazy układu krążenia żywych myszy lub chomików, z niespotykaną dotąd ostrością.

Preclinical Imaging - A versatile technology to monitor cellular responses and molecular mechanisms of disease *in vivo*.

RONALD KOOP^{1*}

¹ Revvity (Germany) GmbH

Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg, Germany

*correspondence address: e-mail: Ronald.Koop@revvity.com

Keywords: preclinical imaging, *in vivo* imaging, bioluminescence, fluorescence, ultrasound, microCT

Several important technologies for preclinical imaging of small animals, like optical imaging, ultrasound and μ CT will be introduced, and application examples will be discussed.

Optical imaging is a very versatile technology to track cells, bacteria and viruses *in vivo*, and determine molecular disease mechanisms, like inflammation and apoptosis for instance.

Ultrasound is an established technology for small animal imaging, and we will present a novel system that doesn't require a handheld ultrasound probe. It is especially build for fast imaging of multiple animals with high reproducibility, independent of the user. This system is optimized for measuring tumor size for instance and has a special module to determine the amount of tissue fibrosis.

The applications for μ CT imaging are ranging from bone imaging to cardiovascular, and from highest resolution to precisely gated imaging of moving objects. We will present an extremely versatile instrument that can measure small mouse bones and animals up to rabbits, produce high resolution images of trabecular structures in mouse bones, as well as cardiovascular images of living mice or hamsters with unprecedented sharpness.

Nowatorski system obrazowania ultradźwiękowego Vega® – pierwszy na świecie niewymagający użycia rąk, przedkliniczny, zautomatyzowany system ultradźwiękowy o dużej przepustowości

RONALD KOOP¹*

¹Revvity (Germany) GmbH

Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg, Germany

* adres do korespondencji: e-mail: Ronald.Koop@revvity.com

Słowa kluczowe: obrazowanie przedkliniczne, obrazowanie *in vivo*, ultrasonografia

Zaprojektowany z myślą o badaczach, nasz bezobsługowy system ultradźwiękowy Vega® to następna generacja przedklinicznego obrazowania ultradźwiękowego. Zawiera innowacyjne podejście do ultradźwięków, które pozwala uzyskać obrazy 2D i 3D wielu myszy o wysokiej rozdzielczości w ciągu zaledwie kilku minut.

System „hands-free” zapewnia bardziej spójne wyniki, ponieważ eliminuje potrzebę stosowania ręcznego przetwornika. W przeciwieństwie do tradycyjnych systemów ultradźwiękowych, system Vega wykorzystuje podejście od dolnej strony badanego zwierzęcia, w którym przetworniki znajdują się pod stolikiem obrazowym.

Dzięki angiografii akustycznej można wizualizować i oceniać ilościowo architekturę i gęstość sieci naczyń nowotworowych oraz ujawniać reakcję na terapię przed zmianami w tkankach. Dzięki zastosowaniu wstrzykiwalnych środków kontrastowych VesselVue®, angiografia akustyczna z systemem Vega umożliwia obrazowanie mikronaczyń o wysokiej czułości, gromadząc obrazy drzew mikronaczyniowych 3D w ciągu kilku minut i obrazów 2D w mniej niż sekundę.

System Vega umożliwi nieinwazyjną ocenę sztywności tkanek związaną ze zwłóknieniem wątroby, chorobami nerek i wieloma innymi problemami w ciągu kilku sekund, dzięki możliwościom systemu w postaci elastografii fali poprzecznej.

Podczas warsztatów zademonstrujemy jak wykorzystać te systemy w badaniach na zwierzętach, w tym w postępowaniu ze zwierzętami, gromadzeniu i analizie danych. Wyjaśnione zostaną zaawansowane funkcje, takie jak angiografia akustyczna i elastografia fali poprzecznej.

Szczegółowa prezentacja konstrukcji i możliwości systemu Vega zostanie połączona z poglądowymi filmami przedstawiającymi działanie systemu i analizą danych w celu zademonstrowania funkcjonalności systemu.

Podczas warsztatów gorąco zachęcamy do zadawania pytań i dyskusji!

The Novel Vega® Ultrasound Imaging System

– The world’s first hands-free, preclinical automated high-throughput ultrasound system.

RONALD KOOP^{1*}

¹ Revvity (Germany) GmbH

Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg, Germany

*correspondence address: e-mail: Ronald.Koop@revvity.com

Keywords: preclinical imaging, in vivo imaging, ultrasound

Designed with researchers in mind, our Vega® hands-free ultrasound system is the next generation of preclinical ultrasound imaging. It incorporates an innovative approach to ultrasound that produces high-resolution 2D and 3D images of multiple mice in just minutes.

A hands-free system delivers more consistent results because it removes the need for a handheld transducer. Unlike traditional ultrasound systems, the Vega system uses a bottom-up approach with the transducers located under the imaging stage.

With acoustic angiography, you can visualize and quantify tumor vessel-network architecture and density or reveal response to therapy before tissue changes. Through use of injectable VesselVue® contrast agents, acoustic angiography with the Vega system enables high-sensitivity imaging of microvasculature, collecting images of 3D microvessel trees in minutes and 2D images in less than a second.

The Vega system allows to assess tissue stiffness associated with liver fibrosis, renal disease, and much more noninvasively, in a matter of seconds, with the system’s shear wave elastography capability.

This workshop will demonstrate how to use these systems in animal research, including animal handling, data acquisition and analysis. Advanced functions like acoustic angiography and shear wave elastography will be explained. A detailed presentation of the design and capabilities of the Vega system will be combined with illustrative videos of system operation and data analysis to demonstrate the functionality of the system.

Questions and discussions are highly encouraged throughout the workshop!

Czynniki abiotyczne i biotyczne determinujące przebieg funkcji rozrodczych u wolno żyjących roślinożerców

ANNA KORZEKWA

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk, Zespół Ochrony Bioróżnorodności, Popielno
a.korzekwa@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: rozród, przeżuwacze, bioróżnorodność

Warunki środowiska, w których rozwija się każdy gatunek podlegają fluktuacjom, wskutek czego część osobników przystosowuje się do nich, a część ginie. Czynniki abiotyczne wynikają z oddziaływania nieożywionych elementów środowiska (dostępność bazy żerowej, tlenu, wody, światła, soli mineralnych, temperatura). Źródłem czynników biotycznych są zależności między żywymi organizmami na danym obszarze (dostępność pokarmu, obecność drapieżników, działalność człowieka). Dodatkowo środowisko może być przekształcone przez człowieka, np. przez zanieczyszczenia, fragmentację czy prowadzenie gospodarki rolnej. Niepokojącym skutkiem działalności człowieka zmieniającym środowisko jest synantropizacja gatunków, w tym dużych roślinożerców. Rozrodczość populacji synantropijnych jest większa niż występujących w naturalnym środowisku ponieważ najczęściej giną i zanikają te gatunki oraz te typy ekosystemów, które mają wąskie amplitudy ekologiczne i lokalne zasięgi; za to rozprzestrzeniają się gatunki obce, o szerokiej skali tolerancji.

W 2023 r. populacja głównych gatunków wolno żyjących roślinożerców w Polsce rozkładała się następująco: 904 tys. zajęcy szaraków, 893 tys. sarny europejskiej, 240 tys. jeleni szlachetnych, 37 493 łosi eurozajatyckich, 35 010 danieli i 2 656 muflonów (wg danych GUS). Miarą stabilnej populacji jest utrzymywanie stałej liczebności gatunkowej w ujęciu długoterminowym, a na dynamikę liczebności populacji wpływa śmiertelność i rozrodczość, co jest istotne w przypadku zwierzyny płowej.

Do połowy lat 70. XX wieku odnotowano w Polsce ponad 3 miliony zajęcy. Według danych GUS od końca lat 90. do 2011 roku liczebność zająca szaraka wahała się w granicach 500 tysięcy i od 2012 roku obserwuje się tendencję wzro-

stową. Dużą rolę w regulacji liczebności gatunku odegrało zwiększenie liczebności lisów w wyniku zastosowania szczepionki na wściekliznę (2002 r.), zaprzestania polowań na lisy dla pozyskania futer oraz wzrostu liczebności ptaków drapieżnych. Cięża u zająca trwa około 42 dni, a w miocie rodzi się od 2 do 4 osobników. W ciągu roku może odbywać się do 4 miotów. Wśród kopytnych roślinożerców na terenie Polski, w ciągu roku występuje jeden miot. Chociaż u sarny możliwe są dwie ruje rocznie, to termin urodzeń (często dwa osobniki w miocie) jest zbliżony ponieważ dochodzi do diapauzy ciążowej. Sarna wykazuje ściśle „przywiązanie” do siedliska (terytorium ograniczone do 2 km²), w odróżnieniu do łosia euroazjatyckiego, potrafiącego przemierzyć kilkadziesiąt kilometrów w ciągu doby. Ten terytorializm sarny sprawił, że obecnie obserwuje się dwa ekotypy: polny i leśny, o różnym fenotypie i behawiorze. Liczebność gatunku w Polsce maleje od 5 lat, szczególnie w ekotypie polnym. Do rodzimych gatunków wolno żyjących roślinożerców nie zalicza się muflonów i danieli ponieważ te gatunki zostały introdukowane. Populacja jelenia szlachetnego jest w Polsce stabilna w ujęciu ostatnich piętnastu lat, natomiast zwiększa się populacja łosia (moratorium od 2001 r.), który konkuruje o bazę żerową z jeleniem. Natomiast ze względu na swoją większą sylwetkę oraz migrujący charakter zyskuje nad nim przewagę.

Populacje kopytnych roślinożerów są elementem ekosystemów lądowych, wpływając na kształt, funkcje i użytkowanie obszarów podlegających ochronie oraz gospodarowaniu. Zwiększony przyrost liczebności i wyższa przeżywalność może prowadzić do tego, że większe populacje przy dużym zagęszczeniu nie będą w stanie utrzymać się wykorzystując wszystkie zasoby pokarmu dostępne w siedlisku, np. w trakcie zimy. Ponadto w zagęszczeniach wzrasta prawdopodobieństwo rozprzestrzeniania się chorób oraz pasożytów. Istnieją obszary, gdzie populacje kopytnych są nadmiernie liczne i oddziałują negatywnie na bioróżnorodność. Punktowy wpływ na roślinność może również prowadzić do zmian w składzie i strukturze roślinności powodowanych przez duże kopytne. Zatem chociaż nadmierna eksploatacja, choroby, drapieżniki, zmiana sposobu użytkowania terenów rolniczych oraz zmiany klimatyczne dziesiątkują populacje niektórych gatunków, powodując konieczność wprowadzenia aktywnej ochrony, to z drugiej strony, zmiany w rolnictwie, brak lub mała liczebność drapieżników, a ostatecznie akomodacja pozwala na niemal nieograniczony wzrost populacji innych gatunków kopytnych.

Badania naukowe prowadzone na wolno żyjących przeżuwaczach są istotne w ujęciu oddziaływań środowiskowych, zarządzania ich liczebnością, ale

również poznania fizjologii *per se*, w tym rozrodu. Opracowane metody biotechnik rozrodu, włączając kriokonserwację gamet mogą być użyteczne dla gatunków jeleniowatych zagrożonych wyginieciem. Analizy laboratoryjne prowadzone na materiale biologicznym pochodzącym od zwierząt wolno żyjących wymagają walidacji ponieważ specyficzne przeciwciała używane w metodach immunoenzymatycznych nie są specyficzne gatunkowo oraz sekwencja kodu genetycznego nie są w pełni poznane. Podstawą tych badań jest materiał biologiczny pobierany bezinwazyjnie i/lub *post mortem*.

Abiotic and biotic factors determining the course of reproductive function in wild herbivores

ANNA KORZEKWA

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences,
Biodiversity Protection Research Team, Popielno
a.korzekwa@pan.olsztyn.pl

Key words: reproduction, ruminants, biodiversity

The environmental conditions in which each species develops are subject to fluctuations, as a result of which some individuals adapt to them and some perish. Abiotic factors, result from the interaction of non-living elements of the environment (availability of food base, oxygen, water, light, mineral salts, temperature). The sources of the biotic factors are the interrelationships between living organisms in the habitat (availability of food, presence of predators, human activities). In addition, the environment can be transformed by humans, e.g. through pollution, fragmentation or the management of farming. A worrying effect of human activity altering the environment is the synanthropisation of species, including large herbivores. Reproduction of synanthropic populations is greater than that found in the natural environment because these species are most likely to die and disappear, and those types of ecosystems that have narrow ecological amplitudes and local ranges; instead alien species with a wide range of tolerances are spreading.

In 2023, the population of the main free-ranging herbivore species in Poland was distributed as follows: 904,000 grey hares, 893,000 European roe deer, 240,000 red deer, 37,493 Eurasian elk, 35,010 fallow deer and 2,656 mouflons (according to Central Statistical Office - CSO data). A measure of a stable population is the maintenance of a constant species abundance in the long term, and population dynamics are influenced by mortality and reproduction, which is important in the case of deer.

More than 3 million hares were recorded in Poland until the mid-1970s. According to the CSO, from the late 1990s to 2011, the hare population fluctuated around 500,000 and since 2012 there has been an upward trend. A large role in the regulation of the species' numbers was played by the increase in the number of foxes as a result of the rabies vaccine (2002), the cessation of fox hunting for fur and the increase in the number of predatory birds. Pregnancy in the hare

lasts approximately 42 days and between 2-4 individuals are born in a litter. There can be up to four litters per year. Among ungulate herbivores in Poland, there is one litter per year. Although it is possible for roe deer to have two oestrus per year, the timing of births (often two individuals) is similar as gestational diapause occurs. The roe deer shows a strict 'attachment' to its habitat (territory limited to 2 km square), unlike the Eurasian moose, which can migrate several tens of kilometers in a day. This territorialism of the roe deer has meant that two ecotypes are now observed: field and forest, with different phenotype and behaviour. The number of the species in Poland has been declining for the past five years, especially in the field ecotype. The native species of free-ranging herbivores do not include mouflons and fallow deer as these species have been introduced.

The red deer population in Poland has been stable over the last fifteen years, while the population of elk (under species protection since 2001), which competes with red deer for a feeding base, is increasing. However, due to its larger silhouette and migratory nature, it is gaining an advantage over it.

Populations of herbivorous ungulates are part of terrestrial ecosystems, influencing the shape, function and use of areas to be protected and managed. Increased abundance growth and higher survival rates can lead to larger populations at high densities not being able to sustain themselves by using all the food resources available in the habitat, e.g. during winter. In addition, at densities, the likelihood of spreading diseases and parasites increases. There are areas where ungulate populations are excessive and have a negative impact on biodiversity. Spot impacts on vegetation can also cause changes in vegetation composition and structure caused by large ungulates. Thus, while overexploitation, diseases, predators, changes in agricultural land use, and climate change are decimating the populations of some species, necessitating active conservation, on the other hand, changes in agriculture, the absence or low abundance of predators, and ultimately adaptation allow for almost unlimited population growth of other ungulate species.

Studies on free-ranging ruminants are important in terms of environmental interactions, management of their numbers, but also to understand their physiology *per se*, including reproduction. The methods developed for reproductive biotechnology, including cryopreservation of gametes, may be useful for cervid species threatened with extinction. Laboratory analyses conducted on biological material from free-living animals need to be validated because the specific antibodies used in immunoassay methods are not species-specific and the sequence of the genetic code is not fully understood. The basis of these studies is biological material collected non-invasively and/or *post mortem*.

Dobrostan ryb w badaniach naukowych

RADOSŁAW KAJETAN KOWALSKI

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

*adres do korespondencji: e-mail: r.kowalski@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: ryby, danio rerio, zebrafish, dobrostan, urozmaicenia, anestezja

Dobrostan ryb w badaniach naukowych jest zagadnieniem zyskującym na znaczeniu w kontekście zwiększonego wykorzystania ryb jako modeli badawczych. Ryby odgrywają kluczową rolę w globalnej produkcji żywności, a także stanowią istotny model w badaniach biologicznych, ze względu na łatwość hodowli, krótki cykl rozwojowy i podobieństwa do innych organizmów, w tym człowieka. Z drugiej strony, procesy związane z uśmiercaniem i transportem ryb w akwakulturze oraz badaniach naukowych stają się przedmiotem kontrowersji, wymagając rozwoju bardziej humanitarnych i efektywnych metod (Mocho *et al.*, 2022). W ostatnich latach opracowano nowe technologie, które mogą znacząco wpłynąć na poprawę dobrostanu ryb. Szok elektryczny, stosowany głównie w celu humanitarnego uśmiercania, wykazuje szereg zalet, w tym minimalizowanie cierpienia oraz znikomy wpływ na biochemię tkanek, jednak wymaga dalszych badań i adaptacji, aby wyeliminować ryzyko niepożądanych efektów (Mocho *et al.*, 2022). Lidokaina, będąca środkiem znieczulającym, znajduje zastosowanie w anestezji ryb, oferując bezpieczne i mniej stresujące metody anestezji oraz uśmiercania (von Krogh *et al.*, 2021). Niemniej, konieczne są dalsze badania nad jej wpływem na dobrostan ryb (Davis *et al.*, 2022).

W kontekście badań naukowych, ryby stanowią fascynujący i wszechstronny model badawczy, szczególnie w zakresie genetyki, rozwoju, ekologii i zachowania. W szczególności, ryba danio przegowane (*Danio rerio*) zdobyła ogromną popularność w laboratoriach na całym świecie, ze względu na swoje niewielkie rozmiary, łatwość hodowli, szybki rozwój i przezroczystość larw, co umożliwia obserwację procesów rozwojowych na poziomie komórkowym. Pomimo wielu zalet, należy pamiętać o ograniczeniach w przekładaniu wyników badań na inne organizmy, zwłaszcza w kontekście badań nad układem immunologicznym i behawiorem (Valentim *et al.*, 2016).

Wzbogacenie środowiska ryb laboratoryjnych, takie jak dostarczanie kryjówek, roślin, zabawek oraz stymulacji sensorycznej, odgrywa kluczową rolę

w poprawie ich dobrostanu. Badania wykazują, że wzbogacenie środowiska może zmniejszać poziom stresu i poprawiać wyniki badań, co jest szczególnie istotne w kontekście zasad 3R (Reduce, Replace, Refine). Jednak ze względu na ogromną różnorodność gatunkową ryb, konieczne jest dostosowanie strategii wzbogacania do specyficznych potrzeb danego gatunku. W miarę postępu badań i technologii, rośnie świadomość znaczenia dobrostanu ryb w badaniach naukowych, jak i w hodowli akwakulturowej. Konieczne jest jednak stałe śledzenie najnowszych badań nad tymi zagadnieniami, gdyż nasza wiedza w tym obszarze nadal się rozwija.

Literatura:

- [1] Mocho, J. et al. A multi-site assessment of anesthetic overdose, hypothermic shock, and electrical stunning as methods of euthanasia for zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Biology* 11, 546 (2022).
- [2] Davis, A. K., Garner, J., Chu, D. K. & Felt, S. Propofol immersion as a euthanasia method for adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Med.* 72, 50-56 (2022).
- [3] von Krogh, K., Higgins, J., Saavedra Torres, Y. & Mocho, J. Screening of anaesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*) for the induction of euthanasia by overdose. *Biology* 10, 1133 (2021).
- [4] Valentim, A., Félix, L., Carvalho, L. S., Diniz, E. & Antunes, L. A new anaesthetic protocol for adult zebrafish (*Danio rerio*): Propofol combined with lidocaine. *PLoS ONE* 11, e0147747 (2016).

Fish welfare in scientific research

RADOSLAW KAJETAN KOWALSKI

Institute of Animal Reproduction and Food Research

*correspondence address: r.kowalski@pan.olsztyn.pl

Keywords: fish, danio rerio, zebrafish, welfare, anesthesia

Fish welfare in scientific research is an increasingly important topic in the context of rising aquaculture production and the expanded use of fish as research models. Fish play a crucial role in global food production and serve as vital models in biological research due to their ease of breeding, short developmental cycles, genetic accessibility, and similarities to other organisms, including humans. However, the processes related to the slaughter and handling of fish in both aquaculture and scientific research are becoming controversial, necessitating the development of more humane and effective methods (Mocho *et al.*, 2022). In recent years, new technologies, such as electric shock and lidocaine, have been developed that could significantly improve fish welfare. Electric shock, used for both euthanasia and sedation, has several advantages, including minimizing suffering and improving meat quality, though it requires further research and adaptation to eliminate the risk of adverse effects (Mocho *et al.*, 2022). Lidocaine, an anesthetic, is used for fish anesthesia, offering safer and less stressful methods for handling and euthanasia (von Krogh *et al.*, 2021). However, further studies are needed to assess its impact on fish health and consumer safety (Davis *et al.*, 2022).

In the context of scientific research, fish represent a fascinating and versatile model, particularly in genetics, development, ecology, and behavior. The zebrafish (*Danio rerio*), in particular, has gained immense popularity in laboratories worldwide due to its small size, ease of breeding, rapid development, and transparent larvae, which allow for the observation of developmental processes at the cellular level. Despite many advantages, it is essential to consider the limitations in extrapolating research findings to other organisms, particularly in studies of the immune system and behavior (Valentim *et al.*, 2016).

Environmental enrichment for laboratory fish, such as providing shelters, plants, toys, and sensory stimulation, plays a key role in improving their welfare. Studies show that environmental enrichment can reduce stress levels and

enhance research outcomes, which is particularly important in the context of the 3R principles (Reduce, Replace, Refine). However, due to the vast species diversity among fish, enrichment strategies must be tailored to the specific needs of each species. As research and technology advance, there is growing awareness of the importance of fish welfare in both scientific research and aquaculture, necessitating further efforts towards developing standards and regulations to ensure proper care for these animals.

References:

- [1] Mocho, J. et al. A multi-site assessment of anesthetic overdose, hypothermic shock, and electrical stunning as methods of euthanasia for zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Biology* 11, 546 (2022).
- [2] Davis, A. K., Garner, J., Chu, D. K. & Felt, S. Propofol immersion as a euthanasia method for adult zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Med.* 72, 50-56 (2022).
- [3] von Krogh, K., Higgins, J., Saavedra Torres, Y. & Mocho, J. Screening of anaesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*) for the induction of euthanasia by overdose. *Biology* 10, 1133 (2021).
- [4] Valentim, A., Félix, L., Carvalho, L. S., Diniz, E. & Antunes, L. A new anaesthetic protocol for adult zebrafish (*Danio rerio*): Propofol combined with lidocaine. *PLoS ONE* 11, e0147747 (2016).

Jak rozpoznawać i leczyć ból u różnych gatunków zwierząt?

LEK. WET. ROBERT M. KRACZKOWSKI

Klinika weterynaryjna SZMARAGDOWA 24h/7dni

ulica Szmaragdowa 4a

20-570 Lublin

adres do korespondencji: robert.krackowski@icloud.com

Aby skutecznie zapobiegać, rozpoznawać i leczyć ból u zwierząt, kluczo-
we jest zrozumienie, jakie zmiany fizjologiczne wywołuje ból oraz poznanie
mechanizmów odczuwania bólu i procesów neurologicznych z nim związa-
nych. Podczas wykładu zamierzam przedstawić Słuchaczom najnowsze bada-
nia dotyczące rozpoznawania bólu, nie tylko u zwierząt, ale także u ludzi,
ponieważ niektóre narzędzia i metody stosowane w medycynie człowieka mo-
gą znaleźć zastosowanie również u różnych gatunków zwierząt.

W procesie rozpoznawania bólu u zwierząt oceniamy:

1. **Objawy behawioralne:** Zmiany w zachowaniu, które mogą wskazywać na ból, takie jak zmniejszona aktywność, unikanie kontaktu, zmiany w nawykach żywieniowych i picia, czy też agresja lub apatia.
2. **Objawy fizjologiczne:** Zmiany w rytmie serca, częstotliwości oddechu, a także w wyglądzie zewnętrznym zwierzęcia, jak zmieniona postawa, wyraz twarzy, czy napięcie mięśni.
3. **Ocena bólu:** Wykorzystanie narzędzi i skal oceny bólu, dostosowanych do specyfiki różnych gatunków, np. skale punktowe dla gryzoni, które pomagają precyzyjnie określić stopień bólu.

W leczeniu bólu u zwierząt istnieje szeroki wybór środków farmakologicz-
nych, które obejmują:

- Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSAIDs)
- Sterydowe leki przeciwzapalne
- Opioidowe i nieopiodowe leki przeciwbólowe
- Agoniści receptorów alfa-2 i alfa-2A adrenergicznych
- Antagoniści receptorów NMDA

- Leki znieczulające miejscowo
- Kannabinoidy
- Różne suplementy i dodatki żywieniowe.

Dobór odpowiednich leków zależy od wielu czynników, takich jak gatunek zwierzęcia, rodzaj i nasilenie bólu, etap procedury badawczej lub chirurgicznej, stan kliniczny pacjenta, regulacje prawne, a także dostępność danej substancji.

Rozpoznawanie i leczenie bólu u zwierząt laboratoryjnych jest kluczowe dla ich dobrostanu i zgodne z regulacjami etycznymi. Ból u zwierząt manifestuje się zarówno poprzez zmiany behawioralne, jak i fizjologiczne, dlatego istotne jest stosowanie odpowiednich narzędzi oceny, dostosowanych do specyficznych potrzeb danego gatunku. Leczenie bólu powinno obejmować właściwie dobraną farmakoterapię, a także alternatywne metody łagodzenia bólu. Regularne monitorowanie stanu zwierzęcia oraz dokładna dokumentacja są niezbędne dla skutecznego zarządzania bólem u zwierząt laboratoryjnych.

Wykład zakończy się omówieniem praktycznych przypadków klinicznych, które zilustrują różne podejścia do rozpoznawania i leczenia bólu u zwierząt, z uwzględnieniem omawianych metod i narzędzi.

Resocjalizacja małp pochodzących z laboratoriów medycznych, na przykładzie grupy makaków królewskich (*Macaca mulatta*) w Gdańskim Ogrodzie Zoologicznym.

IZABELA PATRYCJA KRAUSE

Gdański Ogród Zoologiczny, ul. Karwieńska 3, 80-328 Gdańsk

adres do korespondencji: e-mail: ikrause@zoo.gda.pl

Słowa kluczowe: małpy, zwierzęta naczelne, resocjalizacja, socjalizacja, laboratoria, badania medyczne

Celem wystąpienia jest przybliżenie problematyki resocjalizacji małp pochodzących z laboratoriów medycznych na przykładzie grupy makaków królewskich (*Macaca mulatta*) w Gdańskim Ogrodzie Zoologicznym. Małpy jako zwierzęta stadne, mają bardzo złożone zachowania oraz potrzeby socjalne. Sposób ich utrzymywania w laboratoriach często nie pozwala im w pełni rozwiniąć wszystkich umiejętności życia w grupie, co stanowi ogromne wyzwanie w ich późniejszej socjalizacji. Nawet niewielkie zmiany sposobu utrzymania zwierząt naczelnych w warunkach laboratoryjnych, takie jak kontakt z innymi osobnikami własnego gatunku, trening medyczny czy szeroko pojęte wzbogacanie środowiska (enrichment), pozytywnie wpływają na późniejszy proces resocjalizacji. Utrzymanie dobrostanu zwierząt wpływa także pozytywnie na jakość wyników przeprowadzanych badań. Makaki królewskie, przez podobieństwo genetyczne i fizjologiczne do człowieka, łatwość obsługi oraz niski stopień zagrożenia (gatunek mniejszej troski LC wg IUCN), są najczęściej używanymi zwierzętami naczelnymi w badaniach medycznych.

W 2005 roku Gdański Ogród Zoologiczny przyjął sześć osobników makaka królewskiego pochodzących z likwidowanego ośrodka w Austrii, z pozyskanych informacji wynikało, że zwierzęta do tej pory były utrzymywane pojedynczo w niewielkich klatkach bez bezpośredniego kontaktu. Nie wykazywały umiejętności prawidłowego komunikowania się, rozwiązywania konfliktów czy odchovu młodych, a opiekunów traktowały wrogo. Proces resocjalizacji prowadzony w gdańskim zoo był bardzo długotrwały i nie zakończył się pełnym sukcesem.

Złożone potrzeby fizjologiczne oraz mentalne ssaków naczelnych wymagają większej uważności i powinny zmierzać do użytkowania małp wyłącznie w uzasadnionych dobrem człowieka sytuacjach, gdy inne metody badań zostały wyczerpane. Zasada 3R (Replacement, Reduction and Refinement) wydaje się dobrym kierunkiem etycznego, odpowiedzialnego i humanitarnego wykorzystywania zwierząt, w tym naczelnych, w badaniach naukowych.

Literatura:

- [1] ZIMS database, Species 360
- [2] Don. E. Wilson, Russel A. Mittermeier “*Handbook of the Mammals of the World*” Lynx Ediciones, 2013
- [3] Lauren M. Robinson, Alexander Weiss Ed. “*Nonhuman Primate Welfare*” Springer 2023
- [4] J.D. Paterson “*Primate behavior*” Waveland Press, INC. 2021
- [5] Geoff Hosey, Vicky Melfi, Sheila Pankhust “*Zoo Animals. Behaviour, Management, and Welfare*” Oxford university Press, 2013
- [6] B. Tylor Bennet, Christian R. Abee, Roy Hendrikson Ed. “*Nonhuman primates in biomedical reaserch. Diseases*”, Academic Press, 1998
- [7] James G Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew, Fred W. Quimby “*Laboratory Animal Medicine*”, Academic Press, 2002

Resocialization of monkeys from medical laboratories, based on the example of a group of Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) in the Gdańsk Zoo.

IZABELA PATRYCJA KRAUSE

Gdański Ogród Zoologiczny, ul. Karwieńska 3, 80-328 Gdańsk

correspondence address: e-mail: ikrause@zoo.gda.pl

Keywords: monkeys, primates, resocialization, laboratories, medical research

The aim of the speech is to present the problems of resocialization of monkeys from medical laboratories into the exclusive group of Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*) in the Gdańsk Zoo. As highly social animals, have very complex behaviour and needs. Their persistence in laboratories often does not allow them to fully express their social behaviour, which poses a huge challenge to their further socialization. Even small changes in laboratory conditions, such as contact with conspecifics, medical training or a broadly understood enrichment, has positive impact on resocialization process. The animal welfare has also affects the results obtained by research. Rhesus Macaque are used as model for human because of their genetic, physiological similarities and low conservation threat level (LC least concern according to IUCN), which is why they are the most frequently used main animals in research.

In 2005, the Gdańsk Zoo obtained 6 individuals of Rhesus Monkeys from a liquidated facility in Austria, based on information obtained that the animals had previously been kept individually in small cages without direct contact with each other. They have no skills in social behaviour, resolving conflicts or rearing of the young, and treat the keepers as enemies. The resocialization process was very difficult and not fully effective.

Complex physiological and mental needs of primates require additional attention and should be used only in justified cases and when other methods of research are exhausted. The 3R framework (Replacement, Reduction and Refinement) seems to be a good ethical direction, appropriate and humane use of animals, including primates, in scientific research.

References:

- [1] ZIMS database, Species 360
- [2] Don. E. Wilson, Russel A. Mittermeier “*Handbook of the Mammals of the World*” Lynx Ediciones, 2013
- [3] Lauren M. Robinson, Alexander Weiss Ed. “*Nonhuman Primate Welfare*” Springer 2023
- [4] J.D. Paterson “*Primate behavior*” Waveland Press, INC. 2021
- [5] Geoff Hosey, Vicky Melfi, Sheila Pankhust “*Zoo Animals. Behaviour, Management, and Welfare*” Oxford university Press, 2013
- [6] B. Tylor Bennet, Christian R. Abee, Roy Hendrikson Ed. “*Nonhuman primates in biomedical reaserch. Diseases*”, Academic Press, 1998
- [7] James G Fox, Lynn C. Anderson, Franklin M. Loew, Fred W. Quimby “*Laboratory Animal Medicine*”, Academic Press, 2002

Wpływ wieku i płci na farmakokinetykę meloksykamu u szczurów

KATARZYNA KRZYWDA^{1*}, ARTUR ŚWIERCZEK¹,
ELŻBIETA WYSKA¹

¹Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

*adres do korespondencji: e-mail: katarzyna.l.krzywda@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: meloksykam, szczur, wiek, płeć, farmakokinetyka

Meloksykam (MLX) należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym, a jego mechanizm działania polega na preferencyjnym hamowaniu cyklooksygenazy-2 [1]. Jest jednym z najczęściej stosowanych leków z tej grupy u psów, gryzoni i innych gatunków. Zalecane dawkowanie u psów to doustne podanie w pierwszym dniu leczenia dawki 0,2 mg/kg, po czym stosowanie dawki podtrzymującej 0,1 mg/kg co 24 godziny. U szczurów zazwyczaj podaje się 0,2 - 2 mg/kg tego leku raz dziennie drogą doustną lub podskórną [2].

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu wieku i płci szczurów na profil farmakokinetyczny MLX po podaniu doustnym wraz z pożywieniem.

Badania przeprowadzono w grupie 24 szczurów (12 samców i 12 samic) Wi-star w wieku 3 miesięcy i 2 lat (po 6 zwierząt każdej płci). MLX w postaci zawiesiny (Meloxidyl 1,5 mg/ml, Ceva) podawano z pożywieniem (Nestle sinlac) w dawce 1 mg/kg. Próbkę krwi do oznaczeń pobierano z żyły ogonowej w różnych punktach czasowych do 120 - 168 h. Stężenia MLX w surowicy oznaczono przy pomocy techniki LC-MS/MS. Analizę farmakokinetyczną przeprowadzono w programie PKanalix (MonolixSuite, Lixoft), a analizę statystyczną w programie Statistica v. 13.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że stężenia badanego leku utrzymywały się do ostatniego mierzonego punktu czasowego u wszystkich zwierząt, a proces eliminacji przebiegał znacznie wolniej u samic niż u samców. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy wartościami średniego czasu przebywania w ustroju ($MRT_{0-\infty}$), pozornego klirensu (CL/F), stałej szybko-

ści eliminacji (z) oraz okresu półtrwania ($t_{0.5}$ z) tego leku u zwierząt różnych płci. Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach parametrów farmakokinetycznych pomiędzy szczurami starszymi i młodymi, co sugeruje iż wiek nie wpływa istotnie na farmakokinetykę, eliminowanego głównie w wyniku metabolizmu w wątrobie, MLX u szczurów.

Z przeprowadzonych badań wynika, że istnieje potrzeba modyfikacji zalecanego schematu dawkowania MLX u tego gatunku z uwzględnieniem płci zwierząt, z uwagi na ryzyko akumulacji tego leku w organizmie samic po podaniu wielokrotnym.

Literatura:

- [1] Aneks I Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2020/20200211147157/anx_147157_pl.pdf.
- [2] https://ratguide.com/meds/nsaids/anti_inflammatory/meloxicam.php

Effect of age and sex on the pharmacokinetics of meloxicam in rats

KATARZYNA KRZYWDA^{1*}, ARTUR ŚWIERCZEK¹,
ELŻBIETA WYSKA¹

¹Department of Pharmacokinetics and Physical Pharmacy,
Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College

*correspondence address: e-mail: katarzyna1.krzywda@uj.edu.pl

Keywords: meloxicam, rat, age, sex, pharmacokinetics

Meloxicam (MLX) belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties. Its mechanism of action is based on preferential inhibition of cyclooxygenase-2 [1]. It is one of the most frequently used drugs from this group in dogs, rodents and other species. The recommended oral dosage for dogs is 0.2 mg/kg on the first day of treatment, followed by a maintenance dose of 0.1 mg/kg every 24 hours. In rats, 0.2 - 2 mg/kg of this drug is usually administered once daily by oral or subcutaneous route [2].

The aim of the study was to assess the effect of age and sex of rats on the pharmacokinetic profile of MLX after its oral administration with food.

The research was carried out in a group of 24 Wistar rats (12 males and 12 females), aged 3 months and 2 years (6 animals of each sex). MLX in the form of a suspension (Meloxidyl 1.5 mg/ml, Ceva) was administered with food (Nestle sinlac) at a dose of 1 mg/kg. Blood samples were collected from the tail vein at various time points up to 120-168 h. MLX concentrations in serum were determined using the LC-MS/MS technique. The pharmacokinetic analysis was performed in the PKanalix program (MonolixSuite, Lixoft, France), and the statistical analysis was performed using Statistica v.13.

The results of the study showed that the concentrations of the tested drug were maintained until the last measured time point in all animals and the elimination process was much slower in female than in male rats. Significant differences were observed between the values of mean residence time ($MRT_{0-\infty}$), apparent clearance (CL/F), elimination rate constant (λ) and half-life ($t_{0.5}$) of this drug in animals of different sexes. There were no significant differences

in the values of pharmacokinetic parameters between old and young rats, which suggests that age does not significantly affect the pharmacokinetics of eliminated mainly by the liver MLX in rats.

The study results indicate that there is a need to modify the recommended dosage regimen of MLX in this species taking into account sex of the animals due to the risk of accumulation of this drug in the body of female rats after repeated administration.

References:

- [1] Aneks I Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2020/20200211147157/anx_147157_pl.pdf.
- [2] https://ratguide.com/meds/nsaids/anti_inflammatory/meloxicam.php

Analiza polimorfizmu genu osteopontyny oraz jego związku z opornością na ketozę u bydła mlecznego

EDYTA A. BAUER, DOMINIKA KUŁAJ*, JOANNA POKORSKA,
SEBASTIAN SAWICKI

Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii
Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

*adres korespondencyjny: dominika.kulaj@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: bydło mleczne, ketoza, osteopontyna

Ketoza, jedna z chorób metabolicznych bydła mlecznego, powoduje poważne straty ekonomiczne wśród hodowców, obniża wydajność mleczną, wpływa na występowanie innych chorób oraz sprzyja wczesnemu brakowaniu krów ze stada. Główną przyczyną występowania zaburzeń metabolicznych u zwierząt są czynniki środowiskowe, ale coraz częściej obserwuje się indywidualne predyspozycje genetyczne sprzyjające tym chorobom¹. Charakterystycznym objawem ketozy jest podwyższony poziom ciał ketonowych (kwasu hydroksymasłowego (BHB), kwasu acetylooctowego i acetonu) w płynach ustrojowych^{2,3}. Celem pracy była analiza polimorfizmu c.495C > T genu osteopontyny oraz jego związku z opornością na ketozę u bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (HF). Osteopontyna (OPN) to glikoproteina o wszechstronnych właściwościach, która m.in. bierze udział w funkcjonowaniu układu odpornościowego i jest uważana za przypuszczalny biomarker zmian metabolicznych zachodzących u krów^{4,5}. W badaniu wykorzystano próbki krwi pobrane od 977 krów w różnym wieku (próbki krwi pobierano w ramach standardowych procedur weterynaryjnych). Krew wykorzystano do oznaczenia poziomu BHB oraz do izolacji DNA. Przy pomocy metody PCR–RFLP, w analizowanym locus zidentyfikowano trzy genotypy (CC, CT, TT). Najczęstszym w badanej populacji był genotyp CT (0,50), natomiast najrzadszym TT (0,08). Ketozę najczęściej obserwowano u krów o genotypach CC oraz CT. Do potwierdzenia zależności między genotypem a występowaniem choroby, wykorzystano analizę wagi dowodu (*Weight of Evidence*). Na podstawie krzywej ROC (*Receiver Operating Characteristic*) ustalono, że > 75% krów posiadających genotyp TT w locus c.495C>T genu OPN było odpornych na ketozę. Wyniki badań sugere-

rują, że oznaczanie polimorfizmu w obrębie genu OPN może stać się skuteczną metodą typowania krów odpornych na ketozę.

Numer patentu – Pat.245009

Scientific Reports-Nature: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48771-5>

Literatura:

- [1] Kroezen, V., Schenkel, F. S., Miglior, F., Baes, C. F. & Squires, E. J. 2018. Candidate gene association analyses for ketosis resistance in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 101,5240–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13374>
- [2] Raboisson, D., Moinie, M. & Maigne, E. 2014. Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows; A meta-analysis and review. *J. Dairy Sci.* 97, 7547–7563. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8237>
- [3] Zhang, G. & Ametaj, B. N. 2020. Ketosis an old story under a new approach. *Dairy* 1, 42–60. <https://doi.org/10.3390/dairy1010005>
- [4] Schack, L. et al. Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk, and infant formulas. 2009. *J. Dairy Sci.* 92(11), 5378–5385. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2360>
- [5] Xu, C. et al. Mass spectral analysis of urine proteomic profiles of dairy cows suffering from clinical ketosis. 2015. *Vet. Q.* 35, 133–141. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1055352>

Gene association analysis of an osteopontin polymorphism and ketosis resistance in dairy cattle

EDYTA A. BAUER, DOMINIKA KUŁAJ*, JOANNA POKORSKA,
SEBASTIAN SAWICKI

Department of Animal Reproduction, Anatomy and Genomics,
Faculty of Animal Science,
University of Agriculture in Krakow

*correspondence address: dominika.kulaj@urk.edu.pl

Keywords: dairy cattle, ketosis, osteopontin

Ketosis, one of the metabolic diseases that occur in dairy cattle, severely affects the economics of production, due to its impact on the milk yield, the incidence of other diseases and loss of cows from the herd. Metabolic disorders are caused by environmental factors, but individual genetic predispositions are also observed¹. It is characterized by increased levels of ketone bodies (hydroxybutyric acid (BHB), acetylacetic acid, and acetone) in animal's body fluids^{2,3}. The aim of the study was to analyse the c.495C > T polymorphism of the osteopontin gene and its relationship with resistance to ketosis in Polish Holstein–Friesian (HF) cattle. Osteopontin (OPN), a glycoprotein with versatile properties that among other things, is involved in the functioning of the immune system, is considered a potential biomarker of metabolic changes occurring in cows^{4,5}. The study used blood samples collected from the 977 cows, for the level determination of BHB and for DNA isolation (blood samples were collected as part of standard veterinary procedures). The c.495C > T polymorphism of the OPN gene was determined by PCR–RFLP method. As a result, three genotypes (CC, CT, and TT) are identified at the analysed *locus*. The CT genotype (0.50) was considered the most common, while TT genotype (0.08) was the rarest. Cows with ketosis most often had the CC and CT genotypes, while cows with the TT genotype had the lowest incidence of ketosis. The association between the genotype and ketosis in cows was confirmed by a *Weight of Evidence* (WoE). The distribution of the ROC curve showed that the probability of resistance to ketosis is greater than 75% if the cow has the TT genotype of the OPN gene. Results suggest that the OPN gene might be effective marker to detect the cows with resistance to ketosis.

Patent number- Pat.245009

Scientific Reports – Nature: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48771-5>

References:

- [1] Kroezen, V., Schenkel, F. S., Miglior, E., Baes, C. F. & Squires, E. J. 2018. Candidate gene association analyses for ketosis resistance in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 101, 5240–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13374>
- [2] Raboisson, D., Moinie, M. & Maigne, E. 2014. Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows; A meta-analysis and review. *J. Dairy Sci.* 97, 7547–7563. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8237>
- [3] Zhang, G. & Ametaj, B. N. 2020. Ketosis an old story under a new approach. *Dairy* 1, 42–60. <https://doi.org/10.3390/dairy1010005>
- [4] Schack, L. et al. Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk, and infant formulas. 2009. *J. Dairy Sci.* 92(11), 5378–5385. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2360>
- [5] Xu, C. et al. Mass spectral analysis of urine proteomic profiles of dairy cows suffering from clinical ketosis. 2015. *Vet. Q.* 35, 133–141. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1055352>

Ultrastrukturalne badania choroby Niemann-Picka typu C przy użyciu modelu zebrafish

ŁUKASZ MAJEWSKI^{1,2}, MATYLDA MACIAS³,
ALEKSANDRA SZYBIŃSKA³, JACEK KUŹNICKI¹,
MAŁGORZATA (WIWEGER) KORZENIOWSKA^{4*}

¹Laboratorium Neurodegeneracji, Międzynarodowy Instytut Biologii Komórkowej i Molekularnej w Warszawie, Polska; lmajewski@iimcb.gov.pl

²Pracownia Hodowli Gryzonii, Międzynarodowy Instytut Biologii Komórkowej i Molekularnej w Warszawie, Polska

³Pracownia Mikroskopii i Cytometrii Przepływowej, Międzynarodowy Instytut Biologii Komórkowej i Molekularnej w Warszawie, Polska

⁴Pracownia Inżynierii Białek, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska

*adres do korespondencji: mkorzeniowska@imdik.pan.pl

Słowa kluczowe: choroba Niemann-Pick, danio pręgowany, mikroskopia elektronowa

Choroba Niemann-Picka typu C (NPC) to rzadka lizosomalna choroba spichrzeniowa spowodowana mutacjami w genach *NPC1* lub *NPC2*. Bez względu na rodzaj konkretnej mutacji, NPC cechuje się nieprawidłowym transportem lipidów, co prowadzi do wewnątrzkomórkowego nagromadzenia cholesterolu i glikosfingolipidów. Zaburzenie to prowadzi do postępującego pogorszenia się stanu układu nerwowego, powodując poważne problemy neurologiczne i ostatecznie prowadząc do śmierci.

Danio pręgowany oferuje znaczne korzyści w badaniach nad chorobami ludzkimi z uwagi na swoje genetyczne podobieństwo do człowieka, przejrzystość na wczesnych etapach rozwoju, szybki rozwój, oraz łatwość w manipulacji genetycznej. W niniejszym projekcie badawczym prezentujemy wyniki analizy mikroskopii elektronowej (EM), które porównują ultrastrukturalne cechy homozygotycznych i złożonych heterozygotycznych mutantów *npc2* zebrafish, dostarczając nowych informacji na temat patogenezy choroby Niemann-Picka typu C.

Korzystając z rybiego modelu NPC opracowanego przez naszą grupę badawczą (Wiweger et al., 2021), zbadaliśmy ultrastrukturę komórek w różnych

organach i tkankach. Podobnie jak w komórkach pacjentów i w mysich modelach NPC, komórki mutantów zebrafish *npc2.I^{zawaw302/zawaw302}* wykazują znaczące zmiany w morfologii organelli zarówno u dorosłych osobników, jak i u pięciodniowych larw zebrafish. Zmiany te obejmują nieprawidłowe struktury lizosomalne z nagromadzeniem lameli lipidowych oraz zwiększenie liczby autofagosomów i autofagolizosomów w mózgu. Charakterystyczne zmiany ultrastrukturalne NPC zaobserwowano również w innych tkankach, takich jak przednecze, rdzeń kręgowy, gonady, nerwy boczne, jelito i nabłonek węchowy.

Co ciekawe, negatywne konsekwencje nagromadzenia cholesterolu głównie wpływają na komórki nieneuronalne, a ta obserwacja dostarcza nowych danych na temat patogenezy choroby NPC. Ponadto zidentyfikowaliśmy różne nasilenie fenotypu związane z konkretnymi mutacjami w genie *npc2*. Podczas gdy wariant *npc2.I^{zawaw302/zawaw302}* wykazywał silne zmiany, inny homozygotyczny wariant (*npc2.I^{T9/T9}*) nie ujawniał żadnych zauważalnych objawów chorobowych. Co istotne, złożony heterozygotyczny układ (*npc2.I^{zawaw302/T9}*) wykazał najcięższy fenotyp spośród wszystkich analizowanych genotypów.

Badania te podkreślają potencjał danio przegowanego jako wartościowego modelu organizmu do badania patofizjologii NPC. Uzyskanie głębszego zrozumienia mechanizmów choroby może uutorować drogę do opracowania bardziej skutecznych terapii.

Ultrastructural insights into Niemann-Pick type C disease using a zebrafish model

ŁUKASZ MAJEWSKI^{1,2}, MATYLDA MACIAS³,
ALEKSANDRA SZYBIŃSKA³, JACEK KUŹNICKI¹,
MAŁGORZATA KORZENIOWSKA NÉE WIWEGER^{4*}

¹Laboratory of Neurodegeneration, International Institute of Cell and Molecular Biology in Warsaw, Poland; lmajewski@iimcb.gov.pl

²Rodent Facility, International Institute of Cell and Molecular Biology in Warsaw, Poland

³Microscopy and Flow Cytometry Facility, International Institute of Cell and Molecular Biology in Warsaw, Poland

⁴Laboratory of Protein Engineering, Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

*correspondence address: e-mail: mkorzeniowska@imdik.pan.pl

Keywords: Niemann-Pick disease, zebrafish, electron microscopy

Niemann-Pick Type C (NPC) disease is a rare genetic disorder caused by mutations in the NPC1 or NPC2 genes. It leads to abnormal lipid transport, resulting in cholesterol and glycosphingolipid accumulation in cells. This disrupts the nervous system, causing severe neurological problems and eventually death.

Zebrafish, a model organism similar to humans, offer significant advantages for studying NPC. Their transparency and genetic manipulation capabilities allow for detailed investigation of the disease. This study employs electron microscopy (EM) to compare the ultrastructural features of homozygous and compound heterozygous *npc2* zebrafish mutants, offering insights into Niemann-Pick Type C disease.

Consistent with observations in NPC patients and mouse models, cells of zebrafish *npc2.1*^{review302/ww302} mutant show significant changes in organelle morphology in both adult zebrafish and five-day-old larvae. These changes include abnormal lysosomal structures with an accumulation of lipid lamellae and an increased number of autophagosomes and autophagolysosomes in the brain. The hallmark ultrastructural changes of NPC were also observed in other

tissues such as the pronephros, spinal cord, gonads, lateral nerves, intestine, and olfactory epithelium.

Interestingly, the detrimental effects of cholesterol accumulation primarily affect non-neuronal cells, and with this observation we provide new insights into the pathogenesis of NPC disease. Additionally, we identified different phenotypic manifestations based on specific mutation type in the *npc2* gene. While the *npc2.1^{waww302/waww302}* variant showed pronounced phenotypic effects, another homozygous variant (*npc2.IT⁹/IT⁹*) did not exhibit any noticeable phenotype. Notably, compound heterozygote (*npc2.1^{waww302}/IT⁹*) demonstrated the most severe phenotype among all genotypes analyzed.

This research underscores the potential of zebrafish as a valuable model organism for studying the pathophysiology of NPC. By gaining a deeper understanding of the disease's mechanisms, we can pave the way for the development of more effective therapies.

Systemy eRAS w badaniach naukowych modelowych gatunków ryb oraz akwakulturze zachowawczej

JAN MAZURKIEWICZ^{1*}, MATEUSZ RAWSKI²,
KRZYSZTOF FLORCZYK¹, JAN BANASZAK¹,
PAULA SKRZYPCZAK¹, MARCIN WIŚNIEWSKI³

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Zakład Doświadczalny
Technologii Produkcji Pasz i Akwakultury w Muchocinie,
Muchocin 20, 64-400 Międzychód

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Pracownia Rybactwa Śródlądowego
i Akwakultury, Katedra Zoologii, ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

³Polski Związek Wędkarski Okręg w Poznaniu, ul. Znanieckiego 9, 60-682 Poznań

*adres do korespondencji: e-mail: jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: akwakultura zachowawcza, modelowe gatunki ryb, systemy zwrotnego obiegu wody

Akwakultura to chów oraz hodowla organizmów żyjących w wodzie, utrzymywanych najczęściej w celach konsumpcyjnych. Jest ona alternatywną formą gospodarki dla rybołówstwa, będącego jedną z najstarszych i najbardziej rozpowszechnionych aktywności człowieka warunkującej jego przetrwanie. W skali globalnej akwakultura dostarcza większą ilość produktów niż pozyskiwane jest ze środowiska naturalnego. Dzieje się tak dzięki dywersyfikacji produkcji – obecnie w warunkach kontrolowanych, w akwakulturze towarowej oraz zachowawczej utrzymuje się już ponad 600 taksonów [1, 2]. Mimo wielu zalet, systemy ze zwrotnym obiegiem wody (ang. Recirculated Aquaculture Systems) wciąż nie należą do powszechnie użytkowanych w akwakulturze. Związane jest to przede wszystkim z wysokimi kosztami inwestycji, jak i wyższymi kosztami stałymi w porównaniu do systemów przepływowych. W odpowiednio zaprojektowanych i użytkowanych systemach RAS warunki środowiskowe stają się stabilniejsze w porównaniu do systemów przepływowych, możliwe staje się również dokładne kontrolowanie stężenia substancji chemicznych rozpuszczonych w wodzie, które mogą mieć negatywny wpływ na wyniki produkcyjne. Należy podkreślić również fakt, iż stałe parametry wody są związane z dobrostanem utrzymywanych zwierząt [3] oraz z możliwoś-

cią utrzymywania organizmów bardziej wymagających w miejscach, które nie mają bezpośredniego dostępu do wysokiej jakości wody [4].

Realizacja prac badawczych i rozwojowych w obszarze akwakultury wymaga zastosowania eksperymentalnych systemów recyrkulacyjnych (eRAS) dedykowanych dla poszczególnych grup/gatunków organizmów wodnych. Systemy takie muszą tworzyć optymalne warunki dla utrzymywanych zwierząt przy jednoczesnym spełnieniu poprawności metodycznej prowadzonych eksperymentów.

Badania zrealizowano w ramach operacji pt.: „Innowacyjny system rozrodu i wychowu karpiovatych ryb reofilnych w biologicznie efektywnej i niskoemisyjnej akwakulturze zachowawczej”, umowa o dofinansowanie nr 00002-6521.1-OR1500001/22 zawarta w dniu 9 listopada 2022 roku w ramach działania 2.1 „Innowacje” o których mowa w art. 47 rozporządzenia nr 508/2014 w zakresie Priorytetu 2 – Wspieranie akwakultury zrównoważonej środowiskowo, zasobooszczędnej, innowacyjnej, konkurencyjnej i opartej na wiedzy, zawartego w Programie Operacyjnym „Rybnactwo i Morze”.

Literatura:

- [1] Sicuro B. (2021) World aquaculture diversity: origins and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1619-1634.
- [2] FAO. (2020) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.
- [3] Colt J. (2006) Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34: 143-156.
- [4] Zhang S., Li G., Wu H., Liu X., Yao Y., Tao L., Liu H. (2011) An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering*, 45: 93-102

eRAS systems in scientific research of model fish species and conservation aquaculture

JAN MAZURKIEWICZ^{1*}, MATEUSZ RAWSKI²,
KRZYSZTOF FLORCZYK¹, JAN BANASZAK¹,
PAULA SKRZYPCZAK¹, MARCIN WIŚNIEWSKI³

¹ Poznań University of Life Sciences, Experimental Station of Feed Production
Technology and Aquaculture in Muchocin, Muchocin 20, 64-400 Międzychód

² Poznań University of Life Sciences, Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture,
Department of Zoology, Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań

³ Polish Angling Association, District in Poznań, Znanińskiego 9, 60-682 Poznań

* correspondence address: e-mail: jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl

Keywords: conservation aquaculture, model fish species, recirculated aquaculture systems

Aquaculture is the breeding and farming of organisms living in water, usually kept for consumption purposes. It is an alternative form of economy to fishing, which is one of the oldest and most widespread human activities that determine their survival. On a global scale, aquaculture provides more products than are obtained from the natural environment. This is due to the diversification of production – currently, over 600 taxa are kept in controlled conditions, in commercial and conservative aquaculture [1, 2]. Despite many advantages, systems with reverse water circulation (Recirculated Aquaculture Systems) are still not widely used in aquaculture. This is primarily due to high investment costs and higher fixed costs compared to flow systems. In properly designed and used RAS systems, environmental conditions become more stable compared to flow systems, and it is also possible to precisely control the concentration of chemical substances dissolved in water, which may have a negative impact on production results. It should also be emphasized that constant water parameters are related to animal welfare [3] and to the possibility of rearing more demanding organisms in places that do not have direct access to high-quality water [4]. The implementation of research and development work in the area of aquaculture requires the use of experimental recirculation systems (eRAS) dedicated to particular groups/species of aquatic organisms. Such systems must create optimal conditions for the animals kept while meeting the methodological correctness of the conducted experiments.

This study was carried out as part of the project entitled: “Innovative system of rheophilic cyprinid fishes reproduction and rearing in biologically effective and low emission conservative aquaculture”, no. 00001-6521.1-OR1500001/22, Task 2.1 “Innovations” according to EU Regulation No. 508/2014, Priority 2 – “Supporting environmentally sustainable, resource-efficient, innovative, competitive and knowledge-based aquaculture” realized in the Operational Program “Fisheries and Sea”.

References:

- [1] Sicuro B. (2021) World aquaculture diversity: origins and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1619-1634.
- [2] FAO. (2020) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.
- [3] Colt J. (2006) Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*, 34: 143-156.
- [4] Zhang S., Li G., Wu H., Liu X., Yao Y., Tao L., Liu H. (2011) An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquacultural Engineering*, 45: 93-102

High Content Screening – standaryzacja, automatyzacja i przepustowość w badaniach podstawowych i przedklinicznych jako alternatywna metoda do badań *in vivo*

MAREK MICHAŁOWSKI^{1*}

¹Pro-Environment Polska Sp. z o.o.

02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 101, Polska

*adres do korespondencji: e-mail: marek.michalowski@pepolska.pl

Słowa kluczowe: obrazowanie komórkowe, High Content Screening,
wysokoprzepustowa mikroskopia konfokalna

High Content Screening to technologia z zakresu mikroskopii fluorescencyjnej, konfokalnej oraz mikroskopii światła przechodzącego pozwalająca na uzyskiwanie dużej ilości wyników w krótkim czasie, w wystandaryzowanych warunkach na poziomie pojedynczej komórki.

Pozwala na analizy 2D oraz 3D komórek żywych, komórek utrwalonych, sferoidów, organoidów, układów Organ-on-Chip, skrawków tkankowych oraz organizmów modelowych (m. in. *D. rerio*, *C. elegans*). Dzięki swej wszechstronności stanowi alternatywę dla badań *in vivo* na wstępnych etapach opracowywania leków. Modele doświadczalne opracowane i przetestowane na komórkach, układach 3D czy Organ-on-Chip pozwalają na wybór związków najlepiej rokujących jako kandydaci na leki. Wybrane tą drogą substancje muszą być nadal testowane na zwierzętach laboratoryjnych w końcowych etapach opracowywania leku, ale wykorzystywanie technologii HCS pozwala na znacznie ograniczenie ilości tych zwierząt.

Pełna automatyzacja procesu obrazowania i analizy danych w technologii HCS gwarantuje wysoką standaryzację wyników. HCS stanowi alternatywę do badań *in vivo* na początkowych etapach badań przedklinicznych, umożliwiając uzyskiwanie wyników z badań przesiewowych dla bibliotek związków – kandydatów na leki. Jednocześnie skraca czas takich badań oraz umożliwia jednoczesne prowadzenie badań wieloparametrowych pozwalających na określenie wpływu tych związków na różne aspekty metabolizmu komórkowego.

High Content Screening – standardization, automation and throughput in basic and preclinical research as an alternative method to *in vivo* research

MAREK MICHAŁOWSKI^{1*}

¹ Pro-Environment Polska Sp. z o.o.

02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 101, Polska

*adres do korespondencji: e-mail: marek.michalowski@pepolska.pl

Keywords: cellular imaging, High Content Screening, high-throughput confocal microscopy

High Content Screening is a technology in the field of fluorescence, confocal and transmitted light microscopy that allows obtaining a large number of results in a short time, under standardized conditions at the single-cell level.

It allows 2D and 3D analyzes of living cells, fixed cells, spheroids, organoids, Organ-on-Chip systems, tissue sections and model organisms (including *D. rerio*, *C. elegans*). Thanks to versatility, are a great alternative to *in vivo* tests at the initial stages of drug development. Experimental models developed and tested on cells, 3D systems or Organ-on-Chip allow the selection of compounds with the best promise as drug candidates. Substances selected this way must still undergo animal testing in the final stages, however the use of HCS technology allows for a significant reduction in the number of these animals.

Full automation of the imaging and data analysis process using HCS technology guarantees high standardization of results. HCS provides an alternative to *in vivo* testing in the early stages of preclinical testing, enabling results to be obtained from screening for libraries of compounds - drug candidates. At the same time shorten the time of tests and enable simultaneous multi-parameter research to determine the impact of these compounds on various aspects of cellular metabolism.

Mysie modele choroby Alzheimerera

MATYLDA BARBARA MIELCARSKA*

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW

*adres do korespondencji: e-mail: matylda_mielcarska@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: choroba Alzheimerera, amyloid beta, Tau, model mysy

Choroba Alzheimerera (AD) jest najczęstszą chorobą neurodegeneracyjną na świecie oraz szóstą główną przyczyną śmierci ludzi i jak dotąd nie opracowano skutecznego przeciw niej lekarstwa [1, 2]. Choroba wiąże się z postępującą utratą funkcji poznawczych i może występować w postaci rodzinnej lub sporadycznej. Rodzinna forma AD stanowi 1–5% wszystkich przypadków, podczas gdy forma sporadyczna, występująca najczęściej u pacjentów powyżej 65 roku życia (late-onset AD, LOAD), odpowiada za 95% przypadków [3]. W ostatnim czasie zidentyfikowano szereg genów związanych ze zmianami patologicznymi, charakterystycznymi dla LOAD, obejmującymi nieprawidłowe przetwarzanie amyloidu beta (A β) i białka Tau, dysfunkcje synaptyczne i mitochondrialne, uszkodzenia nerwowo-naczyniowe, stres oksydacyjny oraz procesy zapalne [4]. Ponieważ choroba dotyka wyłącznie ludzi, opracowano wiele zwierzęcych modeli AD, w szczególności mysich, w celu lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów choroby oraz dla oceny potencjalnych terapii. Do badań powszechnie wykorzystywane są transgeniczne modele myszy, niosące mutacje genetyczne związane z rodzinną postacią AD (Familial Alzheimer's Disease, FAD). Istnieją również nowsze generacje modeli myszy, powstałe dzięki technologiom knock-in (KI)/knock-out (KO), edycji genów za pomocą metody CRISPR, a także poprzez wstrzykiwanie lizatów mózgowych od pacjentów z AD, myszy modelowych AD, lub rekombinowanego białka Tau do mózgów zdrowych myszy [5]. Najnowsze modele myszy mogą odzwierciedlać rodzinną bądź sporadyczną postać AD, umożliwiając badania nad chorobą bez nadmiernej ekspresji ludzkich genów. W przyszłości planuje się wprowadzenie modeli AD będących chimerycznymi systemami łączącymi myszy i komórki ludzi, powstałych dzięki transplantacji ludzkich indukowalnych pluripotencjalnych komórek macierzystych (induced Pluripotent Stem Cells, iPSC) do myszy [4].

Literatura:

- [1] Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, Pozo-Molina G, Méndez-Catalá CF, Cardenas-Aguayo MD, Diaz-Cintra S, Pacheco-Herrero M, Luna-Muñoz J, Soto-Rojas LO. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 13;24(4):3754. doi: 10.3390/ijms24043754. PMID: 36835161; PMCID: PMC9966419.
- [2] Kumar A, Sidhu J, Lui F, et al. Alzheimer Disease. [Updated 2024 Feb 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
- [3] Guerreiro R, Bras J. The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2015 Oct 20;7:106. doi: 10.1186/s13073-015-0232-5. PMID: 26482651; PMCID: PMC4617238.
- [4] Zhong MZ, Peng T, Duarte ML, Wang M, Cai D. Updates on mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2024 Mar 11;19(1):23. doi: 10.1186/s13024-024-00712-0. PMID: 38462606; PMCID: PMC10926682.
- [5] Yokoyama M, Kobayashi H, Tatsumi L, Tomita T. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2022 Jun 21;15:912995. doi: 10.3389/fnmol.2022.912995. PMID: 35799899; PMCID: PMC9254908.

Potencjał lipopolisacharydów i standardy strategii badawczych

ANITA MIKOŁAJCZYK

Szkoła Zdrowia Publicznego Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko–Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, Polska
*adres do korespondencji: e-mail: anita.mikolajczyk@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: patogeny przenoszone przez żywność, endotoksyna LPS, modele zwierzęce, zdrowie człowieka, zagrożenie zdrowia publicznego

Na całym świecie patogeny przenoszone drogą pokarmową stanowią poważne zagrożenie zdrowia publicznego. Jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych (toksykoinfekcji pokarmowych) pochodzenia bakteryjnego są Gram-ujemne pałeczki *Salmonella spp.* Poważnym problemem epidemiologicznym związanym z wprowadzeniem tych patogennych bakterii do środowiska i łańcucha pokarmowego jest stan bezobjawowego nosicielstwa. Dokładne wyjaśnienie bezobjawowego nosicielstwa nie zostało jak dotąd poznane. Fakt, że niektóre patogeny mogą pozostać uśpione przez pewien okres czasu może mieć związek ze zjawiskiem tolerancji immunologicznej i/lub kwestią poziomu drobnoustrojów i ich toksyn w organizmie. W organizmie toksyny bakteryjne wywołują szeroką gamę oddziaływań biologicznych. Ponadto coraz częściej w chorobach przewlekłych, takich jak choroby onkologiczne, neurodegeneracyjne, metaboliczne, czy zaburzenia psychiczne, podkreśla się rolę czynników infekcyjnych, w tym bakterii Gram-ujemnych i ich lipopolisacharydów. Mikroorganizmy i ich toksyny mogą przyczyniać się do rozwoju i progresji nowotworów, wpływać na działanie leków przeciwnowotworowych i na przerzuty związane z procesem nowotworowym [Jain i in., 2019; Wheeler and Liss, 2019]. I tak nosicielstwo pałeczek *Salmonella* niedurowych jak i durowych stanowi czynnik ryzyka powstania raka jelita grubego, raka pęcherzyka żółciowego, a także chorób autoimmunologicznych [Iyer i in., 2016; Sima i in., 2024].

Wysoka dawka LPS, podawana zwykle bezpośrednio do istoty czarnej, od lat stosowana jest w doświadczalnych modelach zwierzęcych, naśladujących objawy choroby Parkinsona u ludzi [Huang i in., 2017]. Modele te wykorzystują zdolność LPS do aktywacji komórek mikrogleju i wydzielania mediato-

rów stanu zapalnego. Prozapalne działanie LPS odgrywa również ważną rolę w chorobie Alzheimera, stwardnieniu zanikowym bocznym, czy w zaburzeniach psychicznych z upośledzeniem funkcji poznawczych. Mechanizm w jaki LPS może być związany z chorobami neurodegeneracyjnymi, onkologicznymi i metabolicznymi nie jest dobrze poznany, ale wiadomym jest, że LPS może w tym celu wykorzystywać swoje zdolności do aktywacji receptora TLR4, makrofagów oraz przenikania przez barierę krew-mózg [Zhao i in., 2017].

Systemowe podawanie niskich dawek LPS indukuje produkcję cytokin prozapalnych, które aktywują układ odpornościowy, co skutkuje objawami chorobowym. Nawet zastosowanie pojedynczej subklinicznej niskiej dawki LPS *S. Enteritidis* (dawki, która nie powoduje żadnych objawów choroby) wywołuje dysregulację neuropeptydów w poszczególnych odcinkach jelit i w pęcherzyku żółciowym [Mikołajczyk i in., 2017; Mikołajczyk i Makowska, 2017] oraz zmniejszenie odsetka limfocytów T CD4 i CD8 we krwi bez statystycznie istotnych zmian w poziomach IL-6 i TNF- α w surowicy świni [Mikołajczyk i Złotkowska, 2018]. Ponadto, stosując ten sam model eksperymentalny u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) z podaniem LPS z *S. Enteritidis* w dawce subklinicznej, zaobserwowano dysregulację kluczowych regulatorów osi hormonalnych w wybranych strukturach podwzgórza i gruczołach osi endokrynych: HPA, HPT i HPO [Mikołajczyk i Złotkowska, 2019]. LPS *S. Enteritidis* w subklinicznej dawce wpływa też na ekspresje genów w komórkach kory nadnerczy oraz endometrium świni domowej. Taka endotoksyna w niskiej koncentracji nie powodująca objawów chorobowych może wywoływać zmiany ekspresji w transkryptomie oraz modulować molekularne mechanizmy warunkujące utrzymanie homeostazy w trakcie stanu przypominającego bezobjawowe nosicielstwo [Pauksztó i in., 2019; 2020].

Należy zauważyć, że fakt deregulacji komórek i substancji biologicznie aktywnych pod wpływem nawet tak niskich dawek LPS *S. Enteritidis*, które nie wywołują objawów chorobowych wskazuje, że nie jest etyczne wykonywanie badań dotyczących endotosyn z udziałem ludzi, jeśli nie są znane długotrwałe konsekwencje ich działania. W celu zrozumienia procesów zachodzących w ciele ludzkim sprawdza się model świni domowej, ponieważ świnię są filogenetycznie bliższe ludziom niż gryzoni, a badania z ich udziałem cechują się dobrą powtarzalnością wyników. Gatunek ten charakteryzuje się wysoką zgodnością z organizmem człowieka pod względem anatomicznym, fizjologicznym i immunologicznym.

Objawy działania LPS mogą być różne nie tylko względem zastosowanej w badaniach dawki LPS, ale również w zależności od gatunku bakterii, z którego pochodzi LPS [Pieterse i in., 2016; Fux i in., 2023]. Zastosowanie w badaniach *in vitro* niskiej dawki LPS pochodzących z trzech różnych serotypów pałeczek *Salmonella* nie zmieniło liczby neuronów DRG (biorących udział w unerwieniu zastawki krętniczo-kątniczej), ale wpłynęło na ich chemizm czego przykładem było oddziaływanie LPS pochodzącego z *S. Enteritidis* prowadzące do wzrostu odsetka komórek nerwowych SP-pozytywnych, podczas gdy LPS *S. Minnesota* i LPS *S. Typhimurium* wywarły przeciwny efekt. [Mikołajczyk i in., 2018].

Należy zwrócić uwagę, że oddziaływanie niskich dawek LPS na komórki może być odmienne i zależne nie tylko od gatunku, ale i od serotypów bakterii. Stąd kluczowe jest, by zawsze w opracowaniach wyników prac naukowych podawać pochodzenie użytego w badaniach lipopolisacharydu z dokładnością do serotypu (niestety wielu artykułom brakuje kluczowych informacji na temat konkretnego typu LPS). Badania dotyczące lipopolisacharydów powinny uwzględniać ich dużą zmienność i różnorodność. Ponadto obecność w organizmie LPS *S. Enteritidis* w ilości nie wywołującej objawów chorobowych może powodować nieznaną długofalowe konsekwencje, związane z działaniem na komórki i substancje biologicznie czynne organizmu. Z tego względu w strategiach badawczych i przemyśle farmaceutycznym należy uwzględnić rozważania dotyczące różnej aktywności biologicznej LPS w zależności od różnych źródeł bakterii i długofalowych skutków LPS w różnych dawkach.

Literatura:

Fux A.C., Casonato Melo C., Michelini S., Swartzwelter B.J., Neusch A., Italiani P., Himly M. (2023). Heterogeneity of Lipopolysaccharide as Source of Variability in Bioassays and LPS-Binding Proteins as Remedy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8395, 1-34. <https://doi.org/10.3390/ijms24098395>

Huang B., Liu J., Ju C., Yang D., Chen G., Xu S., Zeng Y., Yan X., Wang W., Liu D., Fu S. (2017). Licochalcone A Prevents the Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Microglial Activation in Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Parkinson's Disease Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2043, 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms18102043>

Iyer P., Barreto S.G., Sahoo B., Chandrani P., Ramadwar M.R., Shrikhande S.V., Dutt A. (2016). Non-typhoidal *Salmonella* DNA traces in gallbladder cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 3(11), 12, 1-4. doi: 10.1186/s13027-016-0057-x

Jain S., Dash P., Minz A. P., Satpathi S., Samal A. G., Behera P. K., Satpathi P. S., Senapati S. (2019). Lipopolysaccharide (LPS) enhances prostate cancer metastasis potentially through NF- κ B activation and recurrent dexamethasone administration fails to suppress it *in vivo*. *The Prostate*, 79(2), 168–182. <https://doi.org/10.1002/pros.23722>

- Mikołajczyk A., Gonkowski S., Złotkowska D. (2017). Modulation of the main porcine enteric neuropeptides by a single low-dose of lipopolysaccharide (LPS) *Salmonella* Enteritidis. *Gut Pathogens*, 9 (73), 1-10. doi: 10.1186/s13099-017-0225-6
- Mikołajczyk A., Kozłowska A., Gonkowski S. (2018). Distribution and neurochemistry of the porcine ileocaecal valve projecting sensory neurons in the dorsal root ganglia and the influence of lipopolysaccharide from different serotypes of *Salmonella* spp. on the chemical coding of DRG neurons in the cell cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), pii: E2551, 1-17. doi: 10.3390/ijms19092551
- Mikołajczyk A., Makowska K. (2017). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the nerve fibers of the porcine gallbladder wall under physiological conditions and after *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharides administration. *Folia Morphologica (Warsz)*, 76 (4), 596-602. doi: 10.5603/FM.a2017.0036
- Mikołajczyk A., Złotkowska D. (2018). Neuroimmunological implications of subclinical lipopolysaccharide from *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), pii: E3274, 1-20. doi: 10.3390/ijms19103274.
- Mikołajczyk A., Złotkowska D. (2019) Subclinical lipopolysaccharide from *Salmonella* Enteritidis induces dysregulation of bioactive substances from selected brain sections and glands of neuroendocrine axes. *Toxins*, 2019, 11(2), pii: E91, 1-24. doi:10.3390/toxins11020091.
- Paukszto L., Mikołajczyk A., Jastrzebski J. P., Majewska M., Dobrzyń K., Kieżun M., Smolinska N., Kaminski T. (2020). Transcriptome, Spliceosome and Editome Expression Patterns of the Porcine Endometrium in Response to a Single Subclinical Dose of *Salmonella* Enteritidis Lipopolysaccharide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4217, 1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms21124217>
- Paukszto L., Mikołajczyk A., Szeszko K., Smolinska N., Jastrzebski J. P., Kaminski, T. (2019). Transcription analysis of the response of the porcine adrenal cortex to a single subclinical dose of lipopolysaccharide from *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1228–1245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.067>
- Pieterse E., Rother N., Yanginlar C., Hilbrands L.B., van der Vlag J. (2016). Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*, 7:484, 1-13 doi: 10.3389/fimmu.2016.00484
- Sima C.M., Buzilă E.R., Trofin F., Păduraru D., Luncă C., Duhaniuc A., Dorneanu O.S., Nastase E.V. (2024). Emerging Strategies against Non-Typhoidal Salmonella: From Pathogenesis to Treatment. *Current Issues in Molecular Biology*, 14;46(7):7447-7472. doi: 10.3390/cimb46070442. PMID: 39057083; PMCID: PMC11275306.
- Wheeler K. M., Liss M. A. (2019). The Microbiome and Prostate Cancer Risk. *Current Urology Reports*, 20(10), 66, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11934-019-0922-4>
- Zhao Y., Jaber V., Lukiw W.J (2017). Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(318), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00318>

The potential of lipopolysaccharides and standards of research strategies

ANITA MIKOŁAJCZYK

School of Public Health Collegium Medicum

University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn, Poland

*correspondence address: e-mail: anita.mikolajczyk@uwm.edu.pl

Keywords: foodborne pathogens, endotoxin LPS, animal models, human health, public health threat

Throughout the world, foodborne pathogens are a serious public health threat. One of the most common causes of foodborne toxic infections of bacterial origin is Gram-negative *Salmonella* spp. Epidemiologically, a major issue associated with the introduction of these pathogenic bacteria into the environment and food chain is the state of asymptomatic carriers. An exact explanation for asymptomatic carriage is so far unknown. The fact that some pathogens can remain dormant for a certain period of time may be related to the phenomenon of immune tolerance and/or the issue of the level of microorganisms and their toxins in the body. On the systemic level, bacterial toxins induce a range of biological activities. Moreover, for chronic diseases such as mental, oncological, neurodegenerative and metabolic diseases, the role of infectious agents, including Gram-negative bacteria and their lipopolysaccharides, is increasingly emphasized. Microorganisms and their toxins may contribute to the development and progression of cancer, affecting the action of anti-cancer drugs and the metastases associated with the neoplastic process [Jain *et al.*, 2019; Wheeler and Liss, 2019]. For example, an asymptomatic carrier state for both non-typhoidal and typhoidal *Salmonella* represents a risk factor for colorectal and gallbladder cancer, as well as autoimmune disorders [Iyer *et al.*, 2016; Sima *et al.*, 2024].

A high dose of LPS, usually administered directly into the substantia nigra, has been used for years in experimental animal models mimicking the symptoms of Parkinson's disease in people [Huang *et al.*, 2017]. These models make use of the LPS ability to activate microglial cells to release the inflammatory mediators. LPS pro-inflammatory activity also plays an important ro-

le in Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis or mental disorders with cognitive function impairment. The mechanism through which LPS may be associated with neurodegenerative, oncological and metabolic diseases is not well understood, but it is known that LPS may use its ability to activate TLR4, macrophages, and cross the blood-brain barrier [Zhao *et al.*, 2017].

Systemic administration of LPS at low doses induces the production of pro-inflammatory cytokines that activate the immune systems, resulting in disease symptoms. Even using a single subclinical low dose of LPS *S. Enteritidis* (a dose that did not cause any symptoms of illness) induced dysregulation of neuropeptides in the particular intestinal segments and gallbladder [Mikołajczyk *et al.*, 2017; Mikołajczyk and Makowska, 2017] and a decrease in the percentage of CD4 and CD8 T lymphocytes in the blood without statistically significant changes in IL-6 and TNF- α levels in the pig serum [Mikołajczyk and Złotkowska, 2018]. Moreover, it was observed that using the same experimental model of the domestic pig (*Sus scrofa domestica L.*), the administration of LPS from *S. Enteritidis* at a subclinical dose induced dysregulation of the levels of the key regulators of the hormonal axes in the selected structures of the hypothalamus and the glands of the endocrine axes (HPA, HPT and HPO) [Mikołajczyk and Złotkowska, 2019]. LPS from *S. Enteritidis* in a subclinical dose also affects gene expression in the adrenal cortex and endometrium cells of domestic pigs. It has been confirmed that such endotoxin in low concentrations, which does not cause disease symptoms, can induce changes in the transcriptome expression and modulate molecular mechanisms that condition the maintenance of homeostasis during a state resembling an asymptomatic carrier state [Pauksztó *et al.*, 2019; 2020].

However, it should be noted that the dysregulation of the cells and biologically active substances induced by such low doses of LPS *S. Enteritidis*, which do not cause symptoms of illness, shows that it is not ethical to conduct research involving the use of endotoxins on people if the long-term consequences of their use are not known. To understand the processes occurring in the human body, the domestic pig model is used because pigs are phylogenetically closer to people than rodents, and the studies on them produce repeatable results. This species is very similar to the human body anatomically, physiologically, and immunologically.

The symptoms of LPS activity may differ not only depending on the LPS dose used in the studies but also on the bacterial species from which LPS was derived [Pieterse *et al.*, 2016; Fux *et al.*, 2023]. The use of a low dose of LPS in *in*

vitro studies involving LPS derived from three different *Salmonella* serotypes did not change the number of DRG neurons (neurons participating in the innervation of the ileocecal valve) but affected their neurochemistry, an example being the activity of *S. Enteritidis* LPS resulting in an increase in the percentage of SP-positive neurons, while *S. Minnesota* LPS and *S. Typhimurium* LPS exerted the contrary effect [Mikołajczyk *et al.*, 2018].

It should be noted that the activity of low doses of LPS on the cells may vary and may depend not only on the species but also on the serotypes of the bacteria. Therefore, it is crucial in publications to always report the origin of the lipopolysaccharide used in the research, down to the serotype (unfortunately, many articles lack key information about a specific type of LPS). Studies on lipopolysaccharides should take into account their high variability and diversity. Moreover, the presence of LPS *S. Enteritidis* in the body in an amount which does not induce any symptoms of illness may bring about unknown long-term consequences associated with its action on the cells and biologically active substances of the body. Taking the above into consideration, research strategies and the pharmaceutical industry should take into account the diverse biological activity of LPS, dependent on the sources of the bacteria and the long-term consequences of LPS used in various doses.

References:

- Fux A.C., Casonato Melo C., Michelini S., Swartzwelter B.J., Neusch A., Italiani P., Himly M. (2023). Heterogeneity of Lipopolysaccharide as Source of Variability in Bioassays and LPS-Binding Proteins as Remedy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8395, 1-34. <https://doi.org/10.3390/ijms24098395>
- Huang B., Liu J., Ju C., Yang D., Chen G., Xu S., Zeng Y., Yan X., Wang W., Liu D., Fu S. (2017). Licochalcone A Prevents the Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Microglial Activation in Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Parkinson's Disease Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2043, 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms18102043>
- Iyer P., Barreto S.G., Sahoo B., Chandrani P., Ramadwar M.R., Shrikhande S.V., Dutt A. (2016). Non-typhoidal *Salmonella* DNA traces in gallbladder cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 3(11), 12, 1-4. doi: 10.1186/s13027-016-0057-x
- Jain S., Dash P., Minz A. P., Satpathi S., Samal A. G., Behera P. K., Satpathi P. S., Senapati S. (2019). Lipopolysaccharide (LPS) enhances prostate cancer metastasis potentially through NF- κ B activation and recurrent dexamethasone administration fails to suppress it *in vivo*. *The Prostate*, 79(2), 168–182. <https://doi.org/10.1002/pros.23722>
- Mikołajczyk A., Gonkowski S., Złotkowska D. (2017). Modulation of the main porcine enteric neuropeptides by a single low-dose of lipopolysaccharide (LPS) *Salmonella* Enteritidis. *Gut Pathogen*, 9 (73), 1-10. doi: 10.1186/s13099-017-0225-6

Mikołajczyk A., Kozłowska A., Gonkowski S. (2018). Distribution and neurochemistry of the porcine ileocaecal valve projecting sensory neurons in the dorsal root ganglia and the influence of lipopolysaccharide from different serotypes of *Salmonella* spp. on the chemical coding of DRG neurons in the cell cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), pii: E2551, 1-17. doi: 10.3390/ijms19092551

Mikołajczyk A., Makowska K. (2017). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the nerve fibers of the porcine gallbladder wall under physiological conditions and after *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharides administration. *Folia Morphologica (Warsz)*, 76 (4), 596-602. doi: 10.5603/FM.a2017.0036

Mikołajczyk A., Złotkowska D. (2018). Neuroimmunological implications of subclinical lipopolysaccharide from *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), pii: E3274, 1-20. doi: 10.3390/ijms19103274.

Mikołajczyk A., Złotkowska D. (2019) Subclinical lipopolysaccharide from *Salmonella* Enteritidis induces dysregulation of bioactive substances from selected brain sections and glands of neuroendocrine axes. *Toxins*, 2019, 11(2), pii: E91, 1-24. doi:10.3390/toxins11020091.

Pauksztó L., Mikołajczyk A., Jastrzebski J. P., Majewska M., Dobrzyń K., Kieżun M., Smolinska N., Kaminski T. (2020). Transcriptome, Spliceosome and Editome Expression Patterns of the Porcine Endometrium in Response to a Single Subclinical Dose of *Salmonella* Enteritidis Lipopolysaccharide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4217, 1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms21124217>

Pauksztó L., Mikołajczyk A., Szeszko K., Smolinska N., Jastrzebski J. P., Kaminski, T. (2019). Transcription analysis of the response of the porcine adrenal cortex to a single subclinical dose of lipopolysaccharide from *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1228–1245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.067>

Pieterse E., Rother N., Yanginlar C., Hilbrands L.B., van der Vlag J. (2016). Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*, 7:484, 1-13 doi: 10.3389/fimmu.2016.00484

Sima C.M., Buzilă E.R., Trofin F., Păduraru D., Luncă C., Duhaniuc A., Dorneanu O.S., Nastase E.V. (2024). Emerging Strategies against Non-Typhoidal Salmonella: From Pathogenesis to Treatment. *Current Issues in Molecular Biology*, 14;46(7):7447-7472. doi: 10.3390/cimb46070442. PMID: 39057083; PMCID: PMC11275306.

Wheeler K. M., Liss M. A. (2019). The Microbiome and Prostate Cancer Risk. *Current Urology Reports*, 20(10), 66, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11934-019-0922-4>

Zhao Y., Jaber V., Lukiw W.J (2017). Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(318), 1-9.<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00318>

Hiperalgezia indukowana opioidami istotną barierą skutecznej terapii przeciwbólowej

BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ*

Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*adres do korespondencji: e-mail: bozena.obminska-mrukowicz@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: ból, leki opioidowe, hiperalgezia opioidowa, strategie postępowania

Ból jest złożonym doświadczeniem każdego kręgowca, na które składają się aspekty zmysłowe i emocjonalne, a stopień jego nasilenia i następowego odczuwania przez organizm jest zawsze zmienny i zależy od czynników subiektywnych oraz od rodzaju doznanego urazu. Dla każdego organizmu ból stanowi naturalny sygnał chorobowy i pełni funkcję ostrzegawczo-ochronną. Ostrzega organizm przed uszkodzeniem tkanek, chorobą lub urazem oraz wyzwala odruchową odpowiedź organizmu, mającą na celu zminimalizowanie skutków zagrożenia, ograniczyć jego zasięg i zapewnić organizmowi optymalne warunki procesu gojenia. Zatem ból ma za zadanie motywowanie organizmu do zmiany zachowania w celu redukcji jego odczuwania, to znaczy, że ból zawsze wywołuje reakcje unikania co stanowi pozytywną jego rolę. Receptorami bólowymi są nocycyptory. W następstwie ich drażnienia dochodzi do odczuwania bólu przez organizm człowieka czy zwierzęcia. Informacje o bólu docierają do ośrodkowego układu nerwowego wieloma drogami, poprzez rogi tylne rdzenia kręgowego do tworu siatkowatego, wzgórze i kory mózgowej. W tych strukturach ośrodkowego układu nerwowego dochodzi do percepcji bólu czyli jego rozpoznawania i lokalizacji przez organizm. Jest to tzw. ból receptorowy (nocycyptywny), który jest najczęściej występującym rodzajem bólu i który jeżeli ma charakter ostry jest bólem samoograniczającym się i jest najłatwiejszy do wyeliminowania. Ból receptorowy jest zawsze bólem traumatycznym, który pojawia się w efekcie podrażnienia mechanicznego, termicznego czy chemicznego zakończeń nerwowych włókien (nocycyptorów) przez różne substancje, w tym również endogenne mediatory odczynu zapalnego. W przeciwieństwie do bólu ostrego ból przewlekły trwa znacznie dłużej, nie ma wyznaczonej funkcji biologicznej i nie posiada określonego punktu wy-

znaczącego jego zakończeniu. Bardzo specyficznym bólem przewlekłym występującym również u zwierząt jest ból neuropatyczny, który jest zazwyczaj bólem pozareceptorowym. Ból neuropatyczny definiuje się jako ból wywołany przez chorobę bądź uszkodzenie powodujące zaburzenia strukturalne układu somatosensorycznego. Ból neuropatyczny nie pełni zatem fizjologicznej funkcji ostrzegawczej, lecz stanowi samodzielną chorobę układu nerwowego (obwodowego i/lub ośrodkowego), która będzie się utrzymywać pomimo ustania oddziaływania pierwotnego bodźca uszkodzającego przechodząc tym samym w przetrwały ból neuropatyczny, którego nieodzownym objawem klinicznym jest nadwrażliwość wywołana działaniem bodźca, która z biegiem czasu pogłębia się, przechodząc w zjawiska nadmiernej reakcji bólowej nawet na minimalny bodziec. Obecnie przyjmuje się, że kontrola bólu u zwierząt niezależnie od jego typu i czasu trwania stanowi standardowy składnik postępowania terapeutycznego, dlatego też algeziologia jest dynamicznie rozwijającą się specjalnością nauk weterynaryjnych. Z klinicznego punktu widzenia uśmierzenie bólu receptorowego, zwłaszcza ostrego jest z reguły skuteczne przez stosowanie monoterapii przeciwbólowej przez podanie substancji czynnej z grupy opioidów, agonistów receptora 2-adrenergicznych czy też niesteroidowych leków przeciwzapalnych, natomiast wyeliminowanie bólu przewlekłego, w tym neuropatycznego z reguły wymaga terapii skojarzonej.

W medycynie weterynaryjnej grupą leków standardowo wykorzystywaną w anestezjologii weterynaryjnej do zapewnienia analgezji śród- i pooperacyjnej u zwierząt towarzyszących (psy, koty i konie) są opioidy czyli narkotyczne leki przeciwbólowe. Opioidy ze względu na silne działanie przeciwbólowe wykorzystywane są do eliminowania różnych typów bólu nie tylko do zapewnienia analgezji okołoperacyjnej, ale również są stosowane do zwalczania bólu ostrego np., pourazowego, kolkowego czy też nowotworowego. Mechanizm działania analgetycznego opioidów związany jest pobudzeniem receptorów opioidowych μ i κ . Opioidy stanowią grupę leków, które różnią się powinowactwem do trzech typów receptorów opioidowych (μ , δ , κ), rodzajem interakcji z receptorami opioidowymi (czyści agoniści, częściowi agoniści, leki o działaniu agonistyczno-antagonistycznym) co skutkuje na oddziaływanie na endogenne układy kontroli bólu, leki opioidowe różnią się również właściwościami fizykochemicznymi cząsteczki (wielkością, lipofilnością), okresem półtrwania co wyrażone jest czasem działania oraz charakterystyką farmakokinetyczną, a więc przebiegiem procesów wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania w zależności od docelowego gatunku zwierzęcia. Mechanizm działania

analgetycznego opioidów związany jest z pobudzeniem receptorów opioidowych μ i κ . W terapii stosujemy czystych agonistów receptorów opioidowych (morfina, metadon, fentanyl), które pobudzając oba typy receptorów opioidowych wywołują analgezję rdzeniową (hamowanie drogi wstępującej impulsu bólowego) i ponadrdzeniową (pobudzenie drogi zstępującej impulsu bólowego) podobnie jak częściowi agoniści receptorów opioidowych (buprenorfina) oraz leki o działaniu agonistyczno-antagonistycznym (butorfanol), który jako agonista receptora, a antagonist receptoru μ wywołuje jedynie analgezję rdzeniową. Opioidy są z reguły dobrze tolerowane przez docelowe gatunki zwierząt, mogą jednak zwłaszcza cząści agoniści receptorów opioidowych wywołać depresję układu oddechowego co związane jest z pobudzeniem receptora μ . Przy wielokrotnym podaniu niektórych leków z grupy opioidów, pomimo początkowego uzyskiwania dobrej kontroli bólu, może wraz z upływem czasu dojść do nasilenia dolegliwości bólowych. Powodem zaburzonej terapii przeciwbólowej opioidami może być rozwój tolerancji na opioidy (*opioid tolerance*) lub hiperalgezji opioidowej (*opioid induced hyperalgesia*)[1]. Tolerancja na opioidy wiąże się z potrzebą permanentnego zwiększania dawki leku w celu uzyskania takiego samego, pożądanego działania analgetycznego, natomiast hiperalgezja opioidowa jest zjawiskiem polegającym na wystąpieniu lub nasileniu reakcji bólowej po ekspozycji organizmu na opioidy co wskazuje, że leki z tej grupy mogą wywoływać działanie pro-nocyceptywne czyli powodujące stan nocyceptywnej sensytyzacji. Różnice kliniczne pomiędzy tolerancją a hiperalgezią opioidową są trudne do rozpoznania, jednak w przypadku rozwoju tolerancji zmniejszenie dawki podanego opioidu nasili reakcję bólową pacjenta, natomiast w przypadku rozwoju hiperalgezji opioidowej zmniejszenie dawki narkotycznego leku przeciwbólowego zmniejszy odczuwanie przez pacjenta bólu.

Dokładny mechanizm powstania hiperalgezji opioidowej stanowiącej istotny element kliniczny powikłania efektu terapeutycznego tej grupy leków nie jest jednoznacznie wyjaśniony[2, 3]. W przypadku konieczności prowadzenia terapii analgetykami opioidowymi należy pamiętać, że im bardziej „czysty” agonista receptorów opioidowych μ , tym większy posiada potencjał wywoływania hiperalgezji opioidowej. Jednym z mechanizmów rozwoju hiperalgezji opioidowej jest proces zmiany konformacji i desensytyzacji receptorów opioidowych. Receptory opioidowe jako receptory metabotropowe funkcjonalnie związane są z białkami regulacyjnymi G przede wszystkim G_i i G_o . Pobudzenie receptora opioidowego zwłaszcza μ związanego z powyższymi białkami hamuje przewodnictwo bólowe. Podanie leku będącego agonistą

receptorów opioidowych aktywuje w tkance nerwowej syntezę gangliozydu GMI, który doprowadza do oddzielenia się białka receptorowego od białek Gi/Go, natomiast skojarzenie receptora opioidowego z białkiem Gs co skutkuje nasileniem przewodnictwa bólowego. Kolejne mechanizmy działania wyjaśniające rozwój hiperalgezji opioidowej związane są z procesami prowadzącymi do sensytyzacji ośrodkowego układu nerwowego (OUN) co skutkuje obniżeniem progu bólowego. W procesie nasilonej sensytyzacji OUN istotną rolę odgrywają mechanizmy glutaminergiczne. Pobudzenie receptorów N-metylo-D-asparaginowych (NMDA) może wystąpić po podaniu leków opioidowych, które łącząc się z receptorami μ aktywują kinazę proteinową C (PKC) powodując fosforylację receptora NMDA. Receptor ten w stanie spoczynku jest zablokowany jonami magnezu, lecz jego fosforylacja powoduje zneutralizowanie blokady magnezowej i wzrost wpływu jonów wapnia co powoduje zwiększenie przewodnictwa bólowego. Przyjmuje się również, że za rozwój hiperalgezji opioidowej odpowiedzialna jest też endogeny opioid jakim jest dynorfina A, która w stanach przewlekłego bólu i podczas terapii egzogennych leków opioidowych syntetyzowana jest nie tylko w rdzeniu kręgowym ale również w wątrobie. Dynorfina A stymuluje wydzielanie prostaglandyny PGE2 oraz peptydów o właściwościach pronocyceptywnych takich jak cholecystokinina, neuropeptyd FF oraz nocyceptyna-orfanina co nasila reakcję bólową. Dynorfina A poprzez swój prekursor prodynorfinę powoduje także modulację działania receptorów NMDA. Zstępująca kontrola impulsów bólowych może być też związana z aktywacją neuronów *On-Off* w brzuszno-dogłogowej części rdzenia kręgowego (RVM, *rostral ventromedial medulla*), które są wrażliwe na działanie leków opioidowych. Uaktywnienie tych komórek nerwowych może doprowadzić do ułatwienia (*facilitation*) przewodzenia impulsów bólowych drogami wstępującymi. Proces ten jest ułatwiony i nasilony w przypadku stymulacji w rdzeniu kręgowym neuropeptydów drażniących takich jak cholecystokinina i nocyceptyna. Morfina będąca podstawowym czystym agonistą receptorów opioidowych, których pobudzenie wywołuje analgezję rdzeniową i ponadrdzeniową z dużą intensywnością może wywołać hiperalgezję opioidową, ponieważ w wyniku biotransformacji związku macierzystego powstały jeden z jej metabolitów morfino-6- glukuronian łączy się z receptorem opioidowym μ , natomiast drugi metabolit morfino-3-glukuronian pobudza receptor Toll-like₄ (TL4) związany z mikroglejem. Aktywacja tego receptora stymuluje syntezę prozapalnych czynników takich jak TNF- α , interleukin (IL-1 β , IL-6) a także prostaglandyny PGE2.

Występowanie zjawiska hiperalgezji opioidowej może stanowić istotną barierę w skuteczności działania leków opioidowych, grupy analgetyków wykazującej najsilniejsze i najefektywniejsze działanie analgetyczne u pacjentów zwłaszcza onkologicznych. Dlatego też niezwykle istotne jest wdrażanie skutecznych strategii leczenia hiperalgezji opioidowej co można osiągnąć przez: a) wprowadzenie rotacji stosowanych leków opioidowych przez zastąpienie podawania morfiny, hydromorfonu czy fentanylu na stosowanie metadonu (wywiera również działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów NMDA) czy buprenorfiny (wywiera działanie anty-hiperanalgetyczne); b) podawanie opioidów w niskich dawkach w połączeniu z antagonistami receptorów NMDA np. ketaminą, niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, alfa2-agonistami (klonidyną); c) równoczesne podawanie ultraniskich dawek antagonisty receptorów opioidowych np. naloksonu co powoduje upośledzenie aktywności receptorów opioidowych związanych z białkiem Gs zmniejszając przewodnictwo bólowe.[4]

Literatura:

- [1] Mercadante S, Arcuri E, Santoni A.: Opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *CNS Drugs* 2019, 33(10), 943-955
- [2] Yi P, Przybyłkowski P.: Opioid induced hyperalgesia *Pain Med.*, 2015, 16 supp. S32-36
- [3] Lee M., Silverman S., Hansen H., Patel V, Manchikanti L.: A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician*, 2011, 14, 145-161
- [4] Żylicz Z.: Hiperalgezja indukowana opioidami komplikuje leczenie bólu: koncepcja, rozpoznanie i leczenie. *Ból*, 2018, 19(2), 33-37

Opioid-induced hyperalgesia a significant barrier to effective pain therapy

BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ*

Department of Pharmacology and Toxicology,
Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental
and Life Sciences, ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*correspondence address: e-mail: bozena.obminska-mrukowicz@upwr.edu.pl

Keywords: pain, opioid drugs, opioid hyperalgesia, management strategies

Pain is a complex experience of every vertebrate, consisting of sensory and emotional aspects, and the degree of its intensity and subsequent perception by the body is always variable and depends on subjective factors and the type of injury suffered. For every organism, pain is a natural disease signal and serves a warning and protective function. It warns the body of tissue damage, disease or injury and triggers a reflex response of the body, aimed at minimizing the effects of the threat, limiting its range and providing the body with optimal conditions for the healing process. Therefore, pain is intended to motivate the body to change its behavior in order to reduce its perception, which means that pain always triggers avoidance reactions, which is its positive role. Pain receptors are nociceptors. As a result of stimulation of nociceptors, the human or animal body experiences pain. Information about pain reaches the central nervous system in many ways, through the posterior horns of the spinal cord to the reticular formation, thalamus and cerebral cortex. In these structures of the central nervous system, pain is perceived, i.e. recognized and localized by the body. This is the so-called nociceptive pain, which is the most common type of pain and which, if acute, is self-limiting and is the easiest to eliminate. Nociceptive pain is always traumatic pain, which occurs as a result of mechanical, thermal or chemical irritation of the nerve endings of fibers (nociceptors) by various substances, including endogenous mediators of the inflammatory reaction. In contrast to acute pain, chronic pain lasts much longer, has no designated biological function and does not have a specific point marking its end. A very specific chronic pain that also occurs in animals is neuropathic pain, which is usually non-receptor pain. Neuropathic pain is de-

defined as pain caused by a disease or injury causing structural disorders of the somatosensory system. Neuropathic pain does not therefore have a physiological warning function, but is an independent disease of the nervous system (peripheral and/or central), which will persist despite the cessation of the primary damaging stimulus, thus transforming into persistent neuropathic pain, the essential clinical symptom of which is hypersensitivity caused by the stimulus, which deepens over time, transforming into excessive pain reactions even to minimal stimuli. It is currently assumed that pain control in animals, regardless of its type and duration, is a standard component of therapeutic treatment, which is why algesiology is a dynamically developing specialty of veterinary sciences. From a clinical point of view, the relief of receptor pain, especially acute pain, is usually effective through the use of analgesic monotherapy by administering an active substance from the group of opioids, 2-adrenergic receptor agonists or non-steroidal anti-inflammatory drugs, while the elimination of chronic pain, including neuropathic pain, usually requires combination therapy.

In veterinary medicine, the group of drugs commonly used in veterinary anesthesiology to provide intra- and postoperative analgesia in companion animals (dogs, cats and horses) are opioids. Due to their strong analgesic effect, opioids are used to eliminate various types of pain, not only to provide perioperative analgesia, but are also used to eliminate acute pain, e.g. post-traumatic, colic or cancer pain. The mechanism of opioid analgesic action is related to the stimulation of μ and opioid receptors. Opioids are a group of drugs that differ in affinity to three types of opioid receptors (μ , δ , κ), type of interaction with opioid receptors (pure agonists, partial agonists, drugs with agonist-antagonist action) which results in the impact on endogenous pain control systems, opioid drugs also differ in physicochemical properties of the molecule (size, lipophilicity), half-life which is expressed in the duration of action and pharmacokinetic characteristics, i.e. the course of absorption, distribution, metabolism and excretion processes depending on the target animal species. The mechanism of analgesic action of opioids is associated with the stimulation of μ and κ opioid receptors. In therapy, we use pure opioid receptor agonists (morphine, methadone, fentanyl), which by stimulating both types of opioid receptors cause spinal analgesia (inhibition of the ascending pathway of the pain impulse) and supraspinal analgesia (stimulation of the descending pathway of the pain impulse), similarly to partial opioid receptor agonists (buprenorphine) and drugs with agonist-antagonist action (butorpha-

nol), which, as an agonist of the receptor and an antagonist of the μ receptor, causes only spinal analgesia. Opioids are usually well tolerated by the target animal species, but pure opioid receptor agonists in particular can cause respiratory depression, which is associated with the stimulation of the μ receptor. With repeated administration of some drugs from the opioid group, despite initially achieving good pain control, pain symptoms may intensify over time.

The reason for impaired opioid analgesic therapy may be the development of opioid tolerance or opioid-induced hyperalgesia [1]. Tolerance to opioids is associated with the need to permanently increase the drug dose in order to obtain the same, desired analgesic effect, while opioid hyperalgesia is a phenomenon consisting in the occurrence or intensification of a pain reaction after exposure to opioids, which indicates that drugs from this group may induce a pro-nociceptive effect, i.e. causing a state of nociceptive sensitization. Clinical differences between tolerance and opioid hyperalgesia are difficult to recognize, however, in the case of tolerance development, reducing the dose of the administered opioid will intensify the patient's pain reaction, while in the case of opioid hyperalgesia development, reducing the dose of the narcotic analgesic will reduce the patient's pain sensation. The mechanism of opioid hyperalgesia, which is an important clinical element of the complication of the therapeutic effect of this group of drugs, has not been clearly explained [2, 3]. In the case of the necessity of conducting therapy with opioid analgesics, it should be remembered that the more "pure" the μ opioid receptor agonist, the greater its potential to induce opioid hyperalgesia. One of the mechanisms of the development of opioid hyperalgesia is the process of changing the conformation and desensitization of opioid receptors. Opioid receptors, as metabotropic receptors, are functionally related to regulatory G proteins, primarily G_i and G_o . Stimulation of the opioid receptor, especially μ associated with the above proteins, inhibits pain conduction. Administration of a drug that is an opioid receptor agonist activates the synthesis of GM1 ganglioside in the nervous tissue, which leads to the separation of the receptor protein from G_i/G_o proteins, while the association of the opioid receptor with the G_s protein, which results in increased pain conduction. Further mechanisms of action explaining the development of opioid hyperalgesia are related to processes leading to sensitization of the central nervous system (CNS), which results in a lower pain threshold. The excitatory neurotransmitter NMDA plays a central role in the development of opioid hyperalgesia. Sti-

mulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors may occur after the administration of opioid drugs, which, by binding to μ receptors, activate protein kinase C (PKC), causing phosphorylation of the NMDA receptor. In the resting state, this receptor is blocked by magnesium ions, but its phosphorylation neutralizes the magnesium blockade and increases the influence of calcium ions, which causes increased pain conduction. It is also assumed that the development of opioid hyperalgesia is also caused by the endogenous opioid dynorphin A, which in states of chronic pain and during therapy with exogenous opioid drugs is synthesized not only in the spinal cord but also in the liver. Dynorphin A stimulates the secretion of prostaglandin PGE2 and peptides with pronociceptive properties such as cholecystokinin, neuropeptide FF and nociceptin-orphanin, which intensifies the pain response. Dynorphin A, through its precursor prodynorphin, also modulates the activity of NMDA receptors. Descending control of pain impulses may also be associated with the activation of *on-off neurons* in the ventrocephalic part of the spinal cord (RVM, *rostral ventromedial medulla*), which are sensitive to the action of opioid drugs. Activation of these nerve cells may lead to facilitation of the conduction of pain impulses through ascending pathways. This process is facilitated and intensified in the case of stimulation of irritating neuropeptides in the spinal cord such as cholecystokinin and nociceptin. Morphine, which is a basic pure agonist of opioid receptors, the stimulation of which induces spinal and supraspinal analgesia with high intensity, can induce opioid hyperalgesia, because as a result of biotransformation of the parent compound, one of its metabolites, morphine-6-glucuronide, binds to the μ opioid receptor, while the second metabolite, morphine-3-glucuronide, stimulates the Toll-like4 receptor (TL4) associated with microglia. Activation of this receptor stimulates the synthesis of proinflammatory factors such as TNF-alpha, interleukins (IL-1 β , IL-6) and prostaglandins PGE2.

The occurrence of opioid hyperalgesia may constitute a significant barrier to the effectiveness of opioid drugs, a group of analgesics that demonstrates the strongest and most effective analgesic effect in patients, especially oncological patients. Therefore, it is extremely important to implement effective strategies for the treatment of opioid hyperalgesia, which can be achieved by: a) introducing a rotation of opioid drugs by replacing the administration of morphine, hydromorphone or fentanyl with the use of methadone (also has an antagonist effect on NMDA receptors) or buprenorphine (has an anti-hyperalgesic effect); b) administration of opioids in low doses in combination

with NMDA receptor antagonists, e.g. ketamine or non-steroidal anti-inflammatory drugs or alpha2-agonists (clonidine); c) simultaneous administration of ultra-low doses of an opioid receptor antagonist, e.g. naloxone, which causes impairment of the activity of opioid receptors associated with the Gs protein, reducing pain conduction.[4]

References:

- [1] Mercadante S, Arcuri E, Santoni A.: Opioid-induced tolerance and hyperalgesia. *CNS Drugs* 2019, 33(10), 943-955
- [2] Yi P, Pryzbyłowski P: Opioid induced hyperalgesia *Pain Med.*, 2015, 16 supp. S32-36
- [3] Lee M., Silverman S., Hansen H., Patel V, Manchikanti L.: A comprehensive review of opioid- induced hyperalgesia. *Pain Physician*, 2011, 14, 145-161
- [4] Żylicz Z.: Hiperalgezia indukowana opioidami komplikuje leczenie bólu: koncepcja, rozpoznanie i leczenie. *Ból*, 2018, 19(2), 33-37

Rola białek bakterii fermentacji mlekowej w regulacji odporności – badania modelowe

OGRODOWCZYK ANNA^{1*}, ZŁOTKOWSKA DAGMARA¹,
MARKIEWICZ LIDIA¹, WRÓBLEWSKA BARBARA¹

¹ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,

Zespół Immunologii i Mikrobiologii Żywności

*adres do korespondencji: e-mail: a.ogrodowczyk@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: białka, bakterie fermentacji mlekowej, badania modelowe, myszy BALB/c

Immunoreaktywność białek pochodzenia bakteryjnego (BPB) jest to mało znane zagadnienie. Pomimo znacznego spożycia BPB w naszej diecie (w probiotykach oraz produktach fermentowanych), mechanizmy immunologiczne, które mogą one wywoływać, wymagają dokładnych badań. Poznanie mechanizmów reakcji na BPB ważne jest w aspekcie wykorzystania tego białka jako innowacyjnej żywności. Należy pamiętać, że jest to białko obcogatunkowe, na które układ odpornościowy może wykazać nadwrażliwość np. w postaci alergii. Alergia pokarmowa jest powszechnie uznawana za poważny problem zdrowotny, który przekształcił się w globalną epidemię, powodując w konsekwencji rozwój licznych dodatkowych powikłań. Dlatego koniecznością jest ocena immunoreaktywności BPB.

Głównym celem badania była ocena wpływu BPB na parametry układu odpornościowego bariery jelitowej stosując różne, komplementarne modele.

W tym celu dokonano syntezy wybranych BPB reprezentatywnych dla różnych gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [1]. Przetestowano ich wpływ na układ immunologiczny związany z barierą jelitową testowano w modelu *in vitro* (w kokulturze ludzkich komórek epitelialnych (Caco-2) i immunologicznych (PBMC)); w modelu mysim *in vivo* oraz *ex vivo* (u immunizowanych tymi białkami myszy BALB/c oraz na pierwotnych kulturach izolowanych splenocytów); *in silico* stosując oprogramowanie AlgPred2 oraz opracowany sekwencyjny model analizy immunoreaktywności [2].

W badaniach *in silico* wytypowano immunoreaktywne fragmenty badanych BPB odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi związanej z przeciwciałami klas

G i E oraz potencjalnie indukujące odpowiedź prozapalną (wydzielanie prozapalnych IL-2, IFN- oraz proalergicznych IL-4). Prozapalny potencjał BPB potwierdzono w badaniach *in vitro* na komórkach bariery jelitowej Caco-2/PBMC (indukcja ekspresji IL-6, IL-25, CCL20, IL-8, IL-18). Potwierdzono wzmożoną sekrecję IL2, IFN- lecz nie IL-4. W badaniach *in vivo/ex vivo* zgodnie potwierdzono działanie prozapalne i jednak zanotowano działanie proalergiczne przejawiającą się podwyższeniem poziomu IgE, IgG1 oraz IL-4 w surowicy a nie lokalnie w tkankach (jelicie cienkim i śledzionie).

BPB są wysoce immunoaktywne, dlatego konieczna jest skrupulatna weryfikacja ich immunoreaktywności. Stosowanie wzajemnie uzupełniających się modeli (uwzględniających badania na zwierzętach) jest niezbędne w badaniach nowych źródeł białka w diecie.

Badania te zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr projektu 2021/43/D/NZ9/02814).

Literatura:

- [1] Ogrodowczyk A.M., Romaszko E. PLoS ONE, 2024, DOI: 10.1371/journal.pone.0301477
- [2] Ogrodowczyk A.M., Dimitrov I., Wróblewska B. Foods, 2021, DOI: org/10.3390/foods10010163

The role of lactic acid bacteria proteins in the regulation of immunity – model research

OGRODOWCZYK ANNA^{1*}, ZŁOTKOWSKA DAGMARA¹,
MARKIEWICZ LIDIA¹, WRÓBLEWSKA BARBARA¹

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Polish Academy of Sciences in Olsztyn,
Immunology and Food Microbiology Group

*correspondence address: e-mail: a.ogrodowczyk@pan.olsztyn.pl

Keywords: proteins, lactic acid bacteria, model studies, BALB/c mice

The immunoreactivity of bacterial proteins remains an unexplored topic. Despite the substantial consumption of microbial proteins (MP) in our diets (in probiotics and fermented products), the immunologic mechanisms they induce require thorough exploration. Understanding the mechanisms of reaction to MP is important in terms of using this protein as a source of novel food. Their potential allergenicity should be verified.

The primary objective of this study was to evaluate the effects of MP on the intestinal barrier immune system parameters using various, complementary models.

For this purpose, selected MP representatives of different species of bacteria from the *Lactobacillus* genus were synthesized [1]. Their influence on the immune system associated with the intestinal barrier was tested in an *in vitro* model (in coculture of human epithelial cells (Caco-2) and immune cells (PBMC)); *in vivo* and *ex vivo* in mouse model (BALB/c immunized with these proteins and on primary cultures of isolated splenocytes); *in silico* using the AlgPred2 software and developed sequential model of immunoreactivity analysis [2].

The presence of Immunoreactive fragments of studied MPs was confirmed *in silico* model. The prognosed induction of response is associated with antibodies of classes G and E and potentially induces a proinflammatory response (secretion of proinflammatory IL-2, IFN- and proallergic IL-4). The pro-inflammatory potential of MPs was confirmed in *in vitro* trial on coculture of cells Caco-2/PBMC (induction of expression of IL-6, IL-25, CCL20, IL-8, IL-18).

Increased secretion of IL2, IFN- but not IL-4 was confirmed. *In vivo/ex vivo* studies consistently confirmed the proinflammatory effect, but also proallergic effect was noted, manifested by increased levels of IgE, IgG1 and IL-4 in serum and not locally in tissues (small intestine and spleen).

The use of complementary models (including animal studies) is essential in the study of new sources of protein in the diet. Proteins of LAB are highly immunoactive. It is necessary to verify their immunoreactivity.

This study was financially supported by the National Science Centre, Poland (Project No. 2021/43/D/NZ9/02814).

References:

- [1] Ogrodowczyk A.M., Romaszko E. PLoS ONE, 2024, DOI: 10.1371/journal.pone.0301477
- [2] Ogrodowczyk A.M., Dimitrov I., Wróblewska B. Foods, 2021, DOI: org/10.3390/foods10010163.

Możliwości zastosowania technik wspomaganego rozrodu w ochronie bioróżnorodności

WOJCIECH NIŻAŃSKI, AGNIESZKA PARTYKA*

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
* agnieszka.partyka@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: Techniki Wspomaganego Rozrodu (ART), pobieranie nasienia, kriokonserwacja nasienia

Obecnie na Czerwonej Liście IUCN znajduje się ponad 4000 gatunków ssaków i ptaków, sklasyfikowanych jako narażone, zagrożone lub krytycznie zagrożone, a liczba ta nieustannie rośnie. Te dane podkreślają pilną potrzebę kontynuowania, a nawet intensyfikacji wysiłków na rzecz ochrony tych gatunków przed wyginięciem. Ten alarmujący wskaźnik utraty bioróżnorodności wymusił wprowadzenie innowacyjnych podejść w programach ochrony. Jedną z najbardziej obiecujących strategii są Techniki Wspomaganego Rozrodu (ART, z angielskiego: Assisted Reproduction Techniques), które dają nam możliwości zwiększenia sukcesu reprodukcyjnego zagrożonych gatunków. Techniki te mogą łagodzić skutki takich czynników jak utrata siedlisk, kłusownictwo i wąskie gardła genetyczne.

W niniejszym opracowaniu przedstawimy własne badania, które koncentrują się głównie na trzech grupach zwierząt wśród wymienionych klas: dzikich kotach, żubrach europejskich oraz ptakach, w tym pingwinach (Spheniscidae).

Badania nad praktycznym zastosowaniem ART w ratowaniu populacji dzikich kotów prowadzone są od ponad 40 lat. Procedury ART zostały opracowane z wykorzystaniem kota domowego jako modelu, dzięki łatwemu dostępowi do materiału biologicznego pozyskiwanego podczas rutynowo przeprowadzanych gonadektomii. W dziedzinie rozrodu małych zwierząt, ART można podzielić na następujące grupy:

- Metody proste: Optymalizacja płodności i leczenie, takie jak konwencjonalne leczenie niepłodności, pobieranie nasienia, ocena i przechowywanie nasienia oraz inseminacja.

- Metody zaawansowane: dojrzewanie *in vitro* oocytów (IVM), zapłodnienie *in vitro* (IVF) oraz hodowla zarodków *in vitro* (IVC).
- Metody specjalistyczne: Techniki takie jak mikrochirurgiczne aspiracje plemników z najądrzy (MESA), przezskórna aspiracja plemników z najądrzy (PESA), aspiracja igłowa plemników z jądra (TEFNA), ekstrakcja plemników z jądra (TESE) oraz mikrochirurgiczne pobieranie plemników z jądra (MicroTESE).

Niektóre proste i zaawansowane procedury ART zostały opracowane dla kotów, takie jak pobieranie i przechowywanie komórek jajowych. Zarodki zostały pomyślnie transferowane po klasycznym IVF, wstrzyknięciu pojedynczego plemnika do komórki jajowej (ICSI) lub klonowaniu przy użyciu transferu jądrowego komórek somatycznych (SCNT). Dotychczas uzyskano mioty u 10ciu gatunków dzikich kotowatych przy użyciu ART. Główną przeszkodą w stosowaniu biotechnik rozrodu u kotów jest ich niska efektywność. Tylko 20-50% zapłodnionych zarodków osiąga stadium moruli/blastocysty, a średnio tylko 1/5 samic, do których przeniesiono zarodki, utrzymuje ciążę i rodzi potomstwo. Nasz Wrocławski Bank Komórek Somatycznych, Gamet Kotów Domowych i Dzikozijących przechowuje: 527 milionów fibroblastów 12 gatunków dzikich kotowatych, w tym dwóch podgatunków rysia (*Lynx lynx*), oraz 8 ras kotów domowych; 225 oocytów 4 gatunków dzikich kotowatych oraz kota domowego; $2\,913,6 \times 10^6$ (dwa miliardy dziewięćset trzynaście milionów sześćset tysięcy plemników) 7 gatunków dzikich kotowatych, przechowywanych w 113 słómkach.

Obecne programy ochrony żubra europejskiego mają na celu zachowanie cennego materiału genetycznego oraz ograniczenie utraty bioróżnorodności. Realizowane są poprzez tworzenie banku genów i rozwijanie ART w celu zapobiegania przyszłym kojarzeniom krewniaczym. W tych programach istotne jest kriokonserwowanie komórek rozrodczych i ich przygotowanie do tego procesu, co jest kluczowe dla uzyskania dobrej jakości rezerwy genetycznej. W tych technikach ważne są również inne procedury, takie jak dojrzewanie oocytów *in vitro*, zapłodnienie oocytów dojrzałych *in vitro* oraz hodowla zarodków *in vitro*, prowadząca do uzyskania jednego zarodka żubra na biorczynię. Wszystkie te procedury umożliwiły utworzenie Banku Materiału Genetycznego Żubra, który może być stosowany w celu zachowania i ochrony tego gatunku. Nasz Bank Plemników Żubra zawiera próbki pobrane od 29 samców, liczące ponad 30,5 miliarda plemników.

W przypadku ptaków, w przeciwieństwie do wielu ssaków, ART nie są wykorzystywane w tym samym stopniu. Ptaki stanowią dla nas specyficzne wy-

zwanie z powodu kilku czynników biologicznych. Po pierwsze, plemniki ptaków są niezwykle wrażliwe na kriokonserwację, a fakt, że samice są heterogametyczne, dodaje komplikacji. Ponadto, kriokonserwacja oocytów i zarodków u gatunków makrolecycalnych jest niepraktyczna/niemożliwa jak dotąd, z powodu dużych rozmiarów i znaczącej zawartości lipidów w jajach. Ostatnie postępy w kriokonserwacji i technikach rekonstrukcji ras ptaków – z użyciem nasienia, komórek macierzystych, komórek somatycznych i gonad – oferują potencjał dla biobankingu. Jednak każda metoda ma swoje ograniczenia związane z praktycznością, wykonalnością, efektywnością i kosztami. W związku z tym, kriokonserwacja nasienia i sztuczna inseminacja pozostają najczęściej stosowanymi i rozwiniętymi technikami ART dla ptaków. Techniki te są szeroko stosowane zarówno w hodowli komercyjnej, jak i w programach ochrony ptaków dzikich. Nasza Katedra, we współpracy z Ogrodem Zoologicznym we Wrocławiu, prowadzi obecnie projekt opracowania metody kriokonserwacji nasienia pingwinów afrykańskich (*Spheniscus demersus*) w celu stworzenia biobanku zasobów genetycznych krytycznie zagrożonych gatunków.

Podsumowując, należy podkreślić, że dla gatunków zagrożonych każda zebrana próbka jest cenna i kluczowa dla utrzymania bioróżnorodności populacji. Dlatego nawet najprostsze procedury ART, takie jak pobieranie i przechowywanie gamet, odgrywają istotną rolę w programach ochrony gatunkowej. Warto także zaznaczyć potrzebę konsolidacji wysiłków podejmowanych przez różne zespoły specjalizujące się w różnych etapach programu. Organizacja platform logistycznych, edukacyjnych i multicentrycznych wydaje się konieczna, aby osiągnąć szybszy postęp w tej dziedzinie. Umożliwi to synergiczne działania wśród embriologów, lekarzy weterynarii, genetyków oraz zespołów ogrodów zoologicznych i parków narodowych, co pozwoli na uniknięcie strat cennego materiału w przypadku śmierci lub planowanych procedur znieczulenia zwierząt oraz ułatwi wymianę danych i próbek.

Possibilities of using Assisted Reproductive Techniques in biodiversity conservation programs

WOJCIECH NIŻAŃSKI, AGNIESZKA PARTYKA*

Department of Reproduction and Clinic for Farm Animals,
Wroclaw University of Environmental and Life Sciences

* agnieszka.partyka@upwr.edu.pl

Keywords: Assisted Reproductive Techniques (ART), semen collection, semen cryopreservation

Currently, over 4,000 species of mammals and birds are listed on the IUCN Red List, classified as vulnerable, endangered, or critically endangered, and these numbers are continually increasing. These data underscore the critical need to continue and even intensify efforts to protect these species from extinction. This alarming indicator of biodiversity loss has necessitated innovative approaches to conservation programs. One of the most promising strategies is Assisted Reproductive Techniques (ART), which offer the potential to enhance the reproductive success of endangered species. These techniques can mitigate the impact of factors such as habitat loss, poaching, and genetic bottlenecks.

In this study, we will present our own research, which focuses primarily on three groups of animals within the mentioned classes: wild cats, European bison, and birds, including penguins (Spheniscidae).

Studies on the practical application of ART to rescue wild felid populations have been conducted for more than 40 years. ART procedures have been developed using the domestic cat as a model due to the easy access to biological material obtained by routinely performed gonadectomies. In the field of small animal reproduction, ART can be classified into the following groups:

- Simple Methods: Fertility optimization and treatment, such as conventional infertility treatments, semen collection, assessment and preservation, and insemination.
- Advanced Methods: Oocyte *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), and embryo *in vitro* culture (IVC).
- Specialized Methods: Techniques such as Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration (MESA), Percutaneous Epididymal Sperm Aspi-

ration (PESA), Testicular Fine Needle Aspiration (TEFNA), Testicular Extraction (TESE), and Microsurgical Testicular Sperm Extraction (MicroTESE).

Some simple and advanced ART procedures have been developed for felids, such as germ cell collection and banking. Embryos have been successfully transferred following classic IVF, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), or somatic cell nuclear transfer (SCNT) cloning. Up to now, litters have been obtained in 10 wild cat species using ART. The main obstacle to using reproductive biotechniques in cats is their low efficiency. Only 20-50% of fertilized embryos reach the morula/blastocyst stage, and on average, only 1/5 of females to which embryos were transferred maintain pregnancy and deliver. Our Wrocław Bank of Somatic Cells, Gametes of Domestic Cats, and Wild Felidae contains: 527 million fibroblasts from 12 species of wild felids, including two subspecies of lynx (*Lynx lynx*), as well as from 8 breeds of domestic cats. 225 oocytes from 4 species of wild felids and a domestic cat. 2,913.6 million sperm from 7 species of wild felids, frozen in a total of 113 straws.

Current European bison conservation programs aim to preserve valuable genetic material and mitigate biodiversity loss by establishing a germplasm bank and developing ART to prevent potential future inbreeding. Important in those programs is the cryopreservation of reproductive cells and their preparation for this process, which is crucial for obtaining a good quality genetic reserve. In these techniques, other procedures are equally important, such as *in vitro* maturation of immature oocytes, *in vitro* fertilization of matured oocytes, and *in vitro* culture of embryos, resulting in one wisent embryo per donor. All these procedures have facilitated the establishment of a Wisent Germplasm Bank, which can be commonly implemented to preserve and protect this species. Our Wisent Sperm Bank contains samples collected from 29 males, numbering over 30.5 billion spermatozoa.

In birds, in contrast, ARTs are not utilized to the same extent as they are in many mammals. Birds present a distinctive challenge due to several biological factors. First, avian semen is extremely sensitive to cryopreservation, and the fact that females are the heterogametic sex adds complexity. Additionally, cryopreservation of oocytes and embryos in macrolecithal species is impractical because of the large size and significant lipid content of the eggs. Recent advancements in cryopreservation and breed reconstruction techniques for birds - using semen, stem cells, somatic cells, and gonads - offer potential for biobanking. However, each method has its own set of limitations related to

practicality, feasibility, efficiency, and cost. Therefore, semen cryopreservation and artificial insemination remain the most widely used and developed ART techniques for birds. These techniques are employed extensively in both commercial breeding and conservation programs for non-domestic birds. Our Department, together with the Wrocław Zoo, is currently conducting a project on the development of a method for cryopreservation of African penguin semen (*Spheniscus demersus*) in order to create a biobank of genetic resources of this critically endangered species.

In conclusion, it is important to emphasize that for endangered species, every collected sample is precious and crucial for maintaining the population's biodiversity. Therefore, even the most basic ART procedures, such as gamete collection and preservation, play a significant role in conservation programs. It is also worth highlighting the need for consolidating efforts conducted by different teams specializing in various stages of the program. The organization of logistic, educational, and multicentric platforms seems necessary to achieve more rapid progress in the field. This will enable synergistic activities among embryologists, veterinarians, geneticists, and zoo and national park teams, allowing them to avoid the loss of valuable material when animals die or are anesthetized and facilitating easier exchange of data and samples.

Organoidy - alternatywa dla wykorzystywania zwierząt w badaniach translacyjnych

ALEKSANDRA PAWLAK*

Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*adres do korespondencji: e-mail: aleksandra.pawlak@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: organoidy, hodowle 3D, metody alternatywne

Medycyna translacyjna obejmuje złożony proces, prowadzący do czerpania korzyści klinicznych z podstawowych odkryć naukowych. Idea badań translacyjnych bazuje na możliwości zastosowania zwierząt jako modeli eksperymentalnych, a najczęściej wykorzystywanymi gatunkami są gryzonię, psy oraz naczelne¹. Chociaż badania translacyjne są obecnie główną siłą napędową w badaniach biomedycznych, coraz częściej mówi się o konieczności zastąpienia żywych zwierząt innymi modelami badawczymi. Kwestie etyczne nie są jedynym wyzwaniem w prowadzeniu badań translacyjnych - kwestionuje się także możliwość przeniesienia wyników uzyskanych na modelach zwierzęcych na ludzi, na przykład w badaniach skuteczności i toksyczności nowych substancji leczniczych. Wątpliwości wobec stosowania modeli zwierzęcych wraz z rosnącym zapotrzebowaniem na personalizowane podejście do pacjenta skłania do dynamicznego rozwoju zaawansowanych technik hodowli *in vitro* – takich jak hodowle organoidów.

Organoidy to trójwymiarowe (3D) wielokomórkowe hodowle tkankowe, które dzięki zachowanej strukturze przestrzennej i heterogenności, mogą naśladować mikro-anatomię i fizjologię odpowiadającego im organu². Organoidy uzyskać można z macierzystych komórek pluripotentnych lub tzw. dorosłych komórek macierzystych. Komórki macierzyste pluripotentne można uzyskać z komórek macierzystych zarodka (ang. *embryonic stem cells, ESC*) lub wyprowadzić z przeprogramowanych dorosłych komórek somatycznych, zwanych indukowanymi komórkami macierzystymi pluripotentnymi (ang. *induced pluripotent stem cells, iPSC*). Kolejnym źródłem komórek, z których możliwe jest uzyskanie organoidów są tzw. dorosłe komórki macierzyste (ang. *adult stem cells, ASC*) czyli nieodróżnicowane komórki, które posiadają zdolność odnowy

i mogą dawać początek nowym komórkom i tkankom np. w przypadku uszkodzenia lub martwicy. Tym samym komórki te, w warunkach hodowli *in vitro* pozwalają na odtworzenie struktury i nierzadko funkcji dojrzałego narządu. W przeciwieństwie do organoidów pochodzących z komórek ASC, struktury pochodzące z ESC i iPSC często przypominają komórki embrionalne lub noworodkowe, nie są więc w pełni dojrzałe i nie wykonują tych samych zadań, co komórki dorosłe *in vivo*. To właśnie dzięki tej różnorodności, hodowle organoidów mogą być stosowane w wielu dziedzinach badań: od biologii rozwojowej, patofizjologii, farmakologii i toksykologii po badania chorób zakaźnych i medycynę regeneracyjną.

W badaniach translacyjnych od lat powszechnie stosuje się ludzkie i mysie organoidy, ale w ciągu ostatniej dekady opracowano także metody uzyskiwania organoidów od różnych gatunków zwierząt. Daje to szerokie możliwości zastosowań badawczych: od badań fizjologii wielu narządów (jelit, wątroby, nerek, trzustki), przez badania inwazyjności patogenów (np. badania nad SARS-COVID-2), płodności, onkologię po produkcję antytoksyn i ochronę ginących gatunków zwierząt³.

Dostęp do nowych modeli w badaniach biomedycznych, pozwalających na uzyskiwanie powtarzalnych wyników i wykonywanie testów przesiewowych *in vitro* jest kluczowe dla rozwoju współczesnej medycyny. Takim modelem wydają się być hodowle organoidów. Podczas gdy wiele organoidów pochodzenia zwierzęcego jest stosowanych w unikalnych badaniach biomedycznych, organoidy z komórek psa można wykorzystać w odwrotnej translacji promując rozwój w medycynie weterynaryjnej i medycynie człowieka jednocześnie.

Literatura:

- [1] Hartl D, de Luca V, Kostikova A, et al. Translational precision medicine: an industry perspective. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):245.
- [2] Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, et al. Human organoids: a new dimension in cell biology. *Molecular Biology of the Cell*. 2019;30(10):1129-1137.
- [3] Gabriel V, Zdyski C, Sahoo DK, et al. Adult animal stem cell-derived organoids in biomedical research and the one health paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(2):701.

Organoids: an alternative to the use of animals in translational research

ALEKSANDRA PAWLAK*

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine,
Wrocław University of Environmental and Life Sciences,
ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*correspondence address: e-mail: aleksandra.pawlak@upwr.edu.pl

Keywords: organoids, 3D cultures, alternative methods

Translational medicine involves a complex process leading to clinical benefits from basic scientific discoveries. Translational research is based on the possibility of using animals as experimental models, and the most commonly used species are rodents, dogs, and primates¹. Although translational research is currently the main driving force in biomedical research, there is an increasing need to replace living animals with other research models. Ethical issues are not the only challenge in conducting translational research; the possibility of transferring results obtained in animal models to humans is also questioned, for example, in studies of the efficacy and toxicity of new drugs. Doubts about using animal models and the growing demand for a personalized approach encourage the dynamic development of advanced *in vitro* cell culture techniques, such as organoid cultures.

Organoids are three-dimensional (3D) multicellular tissue cultures that, thanks to their preserved spatial structure and heterogeneity, can mimic the micro-anatomy and physiology of the corresponding organ². Organoids can be obtained from pluripotent stem cells, also known as adult stem cells. Pluripotent stem cells can be obtained from embryonic stem cells (ESC) or derived from reprogrammed adult somatic cells, called induced pluripotent stem cells (iPSC). Another source of cells from which organoids can be obtained are from adult stem cells (ASC), which are undifferentiated cells with the ability to renew themselves and give rise to new cells and tissues, e.g., in the case of damage or necrosis. Thus, these cells, in *in vitro* culture conditions, allow for the reconstruction of the structure and often the function of a mature organ. Unlike ASC-derived organoids, ESC- and iPSC-derived structures resem-

ble embryonic or neonatal cells, so they are not fully mature and do not perform the same tasks as adult cells *in vivo*. Thanks to this diversity, organoid cultures can be used in many fields of research such as developmental biology, pathophysiology, pharmacology, toxicology, infectious disease, and regenerative medicine.

Human and mouse organoids have been widely used in translational research for years, but methods for obtaining organoids from various animal species also have been developed. This provides a wide range of research applications: from research on the physiology of many organs (intestines, liver, kidneys, pancreas), through pathogen invasiveness studies (e.g. research on SARS-COVID-2), oncology, to the antivenom production and the protection of endangered animal species⁵.

Access to new models, such as organoids, in biomedical research, allow for obtaining repeatable results and performing high-throughput *in vitro* screens, is crucial for the development of modern medicine. While many organoids of animal origin are used in unique biomedical research, organoids from canine cells can be used in reverse translational medicine, promoting the development of both veterinary and human medicine.

References:

- [1] Hartl D, de Luca V, Kostikova A, et al. Translational precision medicine: an industry perspective. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):245.
- [2] Lehmann R, Lee CM, Shugart EC, et al. Human organoids: a new dimension in cell biology. *Molecular Biology of the Cell*. 2019;30(10):1129-1137.
- [3] Gabriel V, Zdyrski C, Sahoo DK, et al. Adult animal stem cell-derived organoids in biomedical research and the one health paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(2):701.

Regulacja metabolizmu cholesterolu jelitowego zależna od układu odpornościowego w mysim modelu ApoE-KO

MEENA KUMARI PALANI KUMAR^{1,2,3,4},
PRAKASH MOTIRAM HALAMI¹,
MUTHUKUMAR SERVA PEDDHA¹, DOROTA WRONKA⁵,
SABRINA GEISBERGER, ARIANA RAUCH, ANNA KARLIK⁵,
THEDA ULRIKE PATRICIA BARTOLOMAEUS^{2,3,4},
ULRIKE LÖBER, NICOLA WILCK, STEFAN KEMPA,
ARASH HAGHIKIA^{7,8,9}, SOFIA K FORSLUND^{2,3,4,6*},
LAJOS MARKÓ^{2,3,4,6*}, LUKASZ PRZYBYL^{5*},

¹CSIR-Central Food Technological Research Institute, Mysuru, India.
Academy of Scientific and Innovative Research, Ghaziabad, India

²Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine
in the Helmholtz Association (MDC), Berlin, Germany

³Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member
of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Germany

⁴Experimental and Clinical Research Center, a joint cooperation between
the Charité Medical Faculty and the Max-Delbrück
Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

⁵Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

⁶Deutsches Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung,
Partner site Berlin, Berlin, Germany

⁷Department of Cardiology, Charité-Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany

⁸German Center for Cardiovascular Research (DZHK),
Partner Site Berlin, Berlin, Germany

⁹Berlin Institute of Health (BIH), Anna-Louisa-Karsch-Str. e 2, Berlin 10178, Germany.*
adres do korespondencji: e-mail: lukasz.przybyl@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: hipercholesterolemia, układ odpornościowy, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Podwyższony poziom cholesterolu we krwi – zwłaszcza poziom cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) – jest dobrze znanym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Podczas gdy dostępne są leki obniżające poziom cholesterolu, ich skutki uboczne stanowią problem u wielu pacjentów i sprawiają, że zaczynają je stosować długoterminowo. Ostatnie badanie wykazało, że metabolit bakteryjny kwas propionowy, rodzaj krótkołańcuchowego kwasu tłuszczowego (SCFA), może zmieniać wychwytywanie LDL w jelitach. W tym badaniu przetestowaliśmy opracowaną formułę żywieniową, produkującą krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe w celu złagodzenia hipercholesterolemii i zbadania jej wpływu w modelu zwierzęcym, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów molekularnych.

Leczenie złagodziło wzrost stężenia LDL w surowicy u myszy ApoE –/– karmionych dietą wysokotłuszczową poprzez modulację ekspresji LDL-R wątrobowego i NPC1L1 jelitowego. Wyniki osiągnięte w mysim modelu sugerują, że podobne podejście może być skuteczne w leczeniu ludzkiej hipercholesterolemii.

Immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism in the ApoE-KO mouse model

MEENA KUMARI PALANI KUMAR^{1,2,3,4},
PRAKASH MOTIRAM HALAMI¹,
MUTHUKUMAR SERVA PEDDHA¹, DOROTA WRONKA⁵,
SABRINA GEISBERGER, ARIANA RAUCH, ANNA KARLIK⁵,
THEDA ULRIKE PATRICIA BARTOLOMAEUS^{2,3,4},
ULRIKE LÖBER, NICOLA WILCK, STEFAN KEMPA,
ARASH HAGHIKIA^{7,8,9}, SOFIA K FORSLUND^{2,3,4,6*},
LAJOS MARKÓ^{2,3,4,6*}, LUKASZ PRZYBYL^{5*},

¹CSIR-Central Food Technological Research Institute, Mysuru, India.

Academy of Scientific and Innovative Research, Ghaziabad, India

²Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine

in the Helmholtz Association (MDC), Berlin, Germany

³Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member
of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Germany

⁴Experimental and Clinical Research Center, a joint cooperation between
the Charité Medical Faculty and the Max-Delbrück
Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

⁵Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

⁶Deutsches Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung,
Partner site Berlin, Berlin, Germany

⁷Department of Cardiology, Charité-Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany

⁸German Center for Cardiovascular Research (DZHK),
Partner Site Berlin, Berlin, Germany

⁹Berlin Institute of Health (BIH), Anna-Louisa-Karsch-Str. e 2, Berlin 10178, Germany.*
adres do korespondencji: e-mail: lukasz.przybyl@ibch.poznan.pl

Keywords: hypercholesterolemia, immune system, short chain fatty acids

Elevated blood cholesterol levels—especially low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels—are well-known risk factors for cardiovascular disease. While cholesterol-lowering medications are available, their side effects are

problematic for many patients and lead them to use them long-term. A recent study showed that the bacterial metabolite propionic acid, a type of short-chain fatty acid (SCFA), can alter LDL uptake in the intestine. In this study, we tested a nutritional formula that produces SCFAs to ameliorate hypercholesterolemia and investigated its effects in an animal model, with a focus on molecular mechanisms. Treatment attenuated the elevation of serum LDL in ApoE $-/-$ mice fed a high-fat diet by modulating the expression of hepatic LDL-R and intestinal NPC1L1. The results obtained in the mouse model suggest that a similar approach may be effective in treating human hypercholesterolemia.

Działanie toksyczne tiamuliny w ludzkich komórkach nerki – badania *in vitro*

ERYKA PANKOWSKA¹, TATIANA WOJCIECHOWSKA²,
MACIEJ GOGULSKI³, LIDIA RADKO^{3*}

¹ Studenckie Koło Naukowe Medyków Weterynaryjnych,
Sekcja Farmakologów I Toksykologów Weterynaryjnych “Paracelsus”,

² Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt,

³ Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych Zwierząt,

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

* correspondence address: lidia.radko@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: leki weterynaryjne, człowiek, komórki HEK-293, cytotoksyczność

Wprowadzenie.

Rosnąca świadomość i potrzeba ochrony zdrowia publicznego, w tym bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego, wymagają dokładnego zbadania mechanizmu działania leków weterynaryjnych u konsumentów. Tiamulina jest często stosowana w leczeniu chorób bakteryjnych u drobiu i świń. Lek jest metabolizowany w wątrobie i wydalany głównie z moczem. W wyniku błędów hodowlanych stężenia dozwolonych pozostałości leku w tkankach zwierzęcych (wątroba, nerki, mięśnie, jaja) są przekraczane, prowadząc do narażenia konsumentów i wystąpienia działań niepożądanych.

Cele.

Określenie mechanizmu toksyczności tiamuliny w komórkach nerki człowieka/konsumenta.

Materiały i metody.

Aktywność cytotoksyczna tiamuliny została zbadana po 72-godzinnej ekspozycji na komórki HEK-293. Stężenia cytotoksyczne (IC₅₀) badanego leku oceniono przy użyciu czterech biochemicznych punktów końcowych: aktywności mitochondrialnej (test MTT), aktywności lizosomalnej (test NRU), proliferacji (test TPC) i integralności błony komórkowej (test LDH). Oceniono

również wpływ na syntezę DNA (test BrdU), stres oksydacyjny i śmierć komórek. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad.

Wyniki.

Długotrwała ekspozycja komórek na tiamulinę wykazała działanie cytotoksyczne leku. Obserwowano zmniejszoną żywotność komórek od najniższego testowanego stężenia $6,25 \mu\text{g/ml}$. Mechanizm działania tiamulin polegał na hamowaniu aktywności lizosomalnej i uszkodzeniu błony komórkowej. Wartości IC₅₀ wahały się od $34,5$ do $175 \mu\text{g/ml}$. Wykazano zależną od stężenia obniżoną syntezę DNA, której towarzyszył wzrost poziomu stresu oksydacyjnego i śmierci komórek w porównaniu z grupą kontrolną.

Wnioski.

Zwiększone ryzyko dla zdrowia ludzi związane z przekroczeniem dopuszczalnych stężeń tiamulin w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego podkreśla potrzebę takich badań. Ponadto istotne jest poszukiwanie rozwiązań mających na celu redukcję pozostałości leków weterynaryjnych w żywności i ograniczenie ich toksycznego wpływu na konsumentów.

Projekt finansowany ze środków budżetu państwa, przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Studenckie Koła Naukowe Tworzą Innowacje” SKN/SP/569523/2023

Toxicity action of tiamulin in human kidney cells – *in vitro* study

ERYKA PANKOWSKA¹, TATIANA WOJCIECHOWSKA²,
MACIEJ GOGULSKI³, LIDIA RADKO^{3*}

¹Students Scientific Society of Veterinary Medicine, Section of Veterinary Pharmacology and Toxicology “Paracelsus”,

²Department of Animal Physiology, Biochemistry and Biostructure,

³Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Poznan University of Life Sciences, Poland

*correspondence address: lidia.radko@up.poznan.pl

Key words: veterinary drug, human, HEK-293 cells, cytotoxicity

Introduction.

Growing awareness and the need to protect public health, including the safety of food of animal origin, demand a thorough investigation of the mechanism of action of veterinary drugs in consumers. Thiamulin is frequently used to treat bacterial diseases in poultry and pigs. The drug is metabolized in the liver and excreted mainly in the urine. As a result of breeding errors, concentrations of drug residues in animal tissues (liver, kidney, muscle, eggs) are exceeded and adverse reactions occur in consumers.

Objectives.

This study aimed to determine the mechanism of thiamulin toxicity in human kidney cells.

Materials and methods.

The cytotoxic activity of thiamulin was investigated after a 72-h exposure to HEK-293 cells. The cytotoxic concentrations (IC₅₀) of the test drug were assessed using four biochemical endpoints: mitochondrial activity (MTT assay), lysosomal activity (NRU assay), proliferation (TPC assay), and cell membrane integrity (LDH assay). Effects on DNA synthesis (BrdU assay), oxidative stress, and cell death were also assessed. Statistical analysis was performed using GraphPad software.

Results.

Long-term exposure to thiamulin had a cytotoxic effect on human kidney HEK-293 cells. Reduced cell viability was observed from the lowest tested concentration of $6.25 \mu\text{g/ml}$. The mechanism of action of thiamulin was through inhibition of lysosomal activity and damage to the cell membrane. IC₅₀ values ranged from 34.5 to $175 \mu\text{g/ml}$. A concentration-dependent reduction in cellular DNA synthesis was demonstrated, accompanied by an increase in the level of oxidative stress and necrotic cells compared to the control.

Conclusions.

The increased risk to human health associated with exceeding acceptable concentrations of thiamulin in food products of animal origin highlights the need for such research. In addition, it is important to seek solutions to reduce the levels of residues of veterinary medicines in food and reduce their toxic effects on consumers.

Projekt finansowany ze środków budżetu państwa, przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki w ramach Programu „Studenckie Koła Naukowe Tworzą Innowacje” SKN/SP/569523/2023

Konwencja Waszyngtońska (CITES), rozporządzenia Unii Europejskiej i przepisy krajowe – znaczenie w badaniach na zwierzętach

MATEUSZ RAWSKI*, PAULA SKRZYPCZAK,
JAN MAZURKIEWICZ

Katedra Zoologii, Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań
*mateusz.rawski@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: CITES, gatunki zagrożone, gatunki niebezpieczne, inwazyjne gatunki obce

W pracy badawczej ze zwierzętami najczęściej o Ustawie z dnia 15 stycznia 2015 o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. Jednak szeregu aspektów związanych z wykorzystaniem gatunków nie zaliczanych do laboratoryjnych, które mogą być użyte w badaniach i dydaktyce dotyczą również ograniczenia, których ustawa nie reguluje. Ograniczenia prawne w obrocie i komercyjnym wykorzystaniu zwierząt zaliczanych do gatunków zagrożonych wyginięciem, niebezpiecznych dla zdrowia i życia ludzi oraz inwazyjnych mają swoje konsekwencje nie tylko dla szeroko rozumianej branży zoologicznej ale również dla użycia zwierząt nieudomowionych w pracach badawczych i edukacji.

Najbardziej znanym ograniczeniem w międzynarodowym obrocie zwierzętami jest Konwencja o międzynarodowym handlu dzikimi zwierzętami i roślinami gatunków zagrożonych wyginięciem (CITES), którą Polska ratyfikowała 12 grudnia 1989 roku. W Unii Europejskiej jej zasady implementuje Rozporządzenie Rady (WE) nr 338/97 z dnia 9 grudnia 1996 r. w sprawie ochrony gatunków dzikiej fauny i flory w drodze regulacji handlu nimi oraz jego przepisy wykonawcze w Rozporządzeniu Komisji WE nr 865/2006 z dnia 4 maja 2006.

W przypadku zwierząt zaliczanych do gatunków niebezpiecznych dla zdrowia i życia ludzi rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 3 sierpnia 2011

nakłada dodatkowe ograniczenia w postaci określonych w nim warunków przetrzymywania i znakowania zwierząt. Kolejną grupą zwierząt do jakiej odnoszą się ograniczenia są inwazyjne gatunki obce, względem których ograniczenia ujęto w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1143/2014 z dnia 22 października 2014 r. w sprawie działań zapobiegawczych i zaradczych w odniesieniu do wprowadzania i rozprzestrzeniania inwazyjnych gatunków obcych (IGO), a przepisy wykonawcze w Polsce ustanowiono na podstawie ustawy z dnia 11 sierpnia 2021 o gatunkach obcych, w której konsekwencji powstał prawdopodobnie najbardziej skomplikowany w Unii Europejskiej system zezwoleń na odstępstwa od zakazów względem IGO.

Podsumowując, w badaniach nad gatunkami nie zaliczanymi do zwierząt laboratoryjnych i udomowionych konieczne jest poruszanie się w szeregu przepisów, których zakres stosowania nie zawsze jest jasny dla naukowców.

Washington Convention (CITES), European Union and Polish regulations – the role in research with animals

MATEUSZ RAWSKI*, PAULA SKRZYPCZAK,
JAN MAZURKIEWICZ

Department of Zoology, Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture,
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,
Poznan University of Life Sciences,
Wojska Polskiego 71 C, 60-625 Poznań, Poland
*mateusz.rawski@up.poznan.pl

Keywords: CITES, endangered species, dangerous species, invasive alien species

In research work with animals mostly considered law regulation is act of 15th January of 2015 on protection of animals used for scientific and educational purposes. However, a number of aspects of non – laboratory animals use for research and didactics is not regulated by mentioned act. Laws and restrictions for commercial use of endangered, dangerous and invasive alien species apply not only do pet trade but also for the use of non domesticated species in research and education.

The most widely known is Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) which was ratified in Poland on 12th December of 1989. Due to our access into European Union its regulations are implemented by Council Regulation (EC) No 338/97 of 9 December 1996 on the protection of species of wild fauna and flora by regulating trade therein and its implementing act: Commission Regulation (EC) No 865/2006 of 4 May 2006 laying down detailed rules concerning the implementation of Council Regulation (EC) No 338/97 on the protection of species of wild fauna and flora by regulating trade therein.

In the case of animals considered as dangerous for human health and live additional restrictions in terms of animal maintenance and marking are implemented by Regulation of the Minister of the Environment of 3th August of 2011.

Another group which use finds limitations are Invasive Alien Species (IAS) which maintenance and use is partially restricted at the level of European

Union by Regulation (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council of 22 October 2014 on the prevention and management of the introduction and spread of invasive alien species. Its implementation to Polish law by act of 11th August 2021 on alien species creates probably the most complicated in European Union system of official permits for exempts for IAS application in European Union.

In conclusion it must be underlined that in studies on non laboratory, non domestic species we need to deal with a number of regulations which areas of application may be not clear for scientists.

Metody alternatywne do badań na zwierzętach

JOANNA ROSZAK

Centrum Metod Alternatywnych do Oceny Toksyczności (CMA),
Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera
*adres do korespondencji: e-mail: joanna.roszak@imp.lodz.pl

Słowa kluczowe: metody alternatywne, *in vitro*, zasada 3R, EURL ECVAM

Co roku, w Polsce i innych krajach UE, wykorzystuje się tysiące zwierząt laboratoryjnych do różnych celów naukowych i edukacyjnych. Badania na zwierzętach budzą jednak coraz częściej wątpliwości etyczne. W ostatnich latach przepisy dotyczące wykorzystywania zwierząt laboratoryjnych stały się bardziej rygorystyczne. Zgodnie z dyrektywą 2010/63/UE zwierzęta można wykorzystywać do celów naukowych lub edukacyjnych wyłącznie wtedy, gdy nie jest dostępna żadna metoda alternatywa – metoda spełniająca przynajmniej jedno z założeń zasady 3R.

Zasada 3R (ang. Replacement-Reduction-Refinement), promuje zastąpienie zwierząt, ograniczenie ich liczby i doskonalenie metod wykorzystujących zwierzęta w badaniach podstawowych, stosowanych, translacyjnych lub prowadzonych w celach regulacyjnych. Wszystkie projekty naukowe planujące wykorzystanie zwierząt muszą zostać poddane ocenie z uwzględnieniem zasady 3R, zanim otrzymają zgodę na ich wykonanie.

Zastąpienie badań na zwierzętach modelami niewykorzystującymi zwierząt jest ogromnym wyzwaniem naukowym, wymagającym opracowania nowych wiarygodnych metod alternatywnych, a także zmiany sposobu myślenia. Coraz częściej pojawiające się metodologie nowego podejścia (ang. New Approach Methodologies, NAMs) obejmują szeroki zakres innowacyjnych technologii, w tym metod *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórkowych 3D, technologii organów na chipie, modeli obliczeniowych.

Ogromnym wsparciem w promowaniu rozwoju i wykorzystania nowych podejść badawczych jest EURL ECVAM - Laboratorium referencyjne Unii Europejskiej w zakresie alternatyw dla testów na zwierzętach (ang. the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing), które odpowiada za walidację nowych metod alternatywnych na terenie UE; jest też głównym punktem informacyjnym na temat istniejących metod alternatywnych

do doświadczeń na zwierzętach, w tym również tych dopiero przedstawionych do walidacji (np. baza TSAR, repozytorium DB-ALM).

Znajomość dostępnych, zwalidowanych metod alternatywnych i źródeł aktualnej wiedzy na ich temat zachęca do stopniowego wdrażania nowych metod niewymagających wykorzystania zwierząt w laboratoriach badawczych.

Alternative methods to animal testing

JOANNA ROSZAK

Center for Alternative Methods to Toxicity Assessment (CMA),
Nofer Institute of Occupational Medicine

*correspondence address: e-mail: joanna.roszak@imp.lodz.pl

Keywords: alternative methods, *in vitro*, the Three Rs principle, EURL ECVAM

Every year, in Poland and other EU countries, thousands of laboratory animals are used for various scientific and educational purposes. However, the use of laboratory animals increasingly raises ethical concerns. The legislation on the use of laboratory animals has become more stringent over the past years. According to Directive 2010/63/EU, animals may be used for scientific or educational purposes only if no alternative method is available - a method that meets at least one of the assumptions of the Three Rs principle.

The 3R principle (Replacement-Reduction-Refinement) promotes the replacement of animals, reduction their number and refinement of methods using animals in basic, applied, translational or regulatory research. All research projects planning to use animals must be assessed in terms of fulfilment the Three Rs principle before they are allowed to proceed.

Replacing animal testing with non-animal models is a huge scientific challenge, requiring the development of new and reliable alternative methods, as well as a change in thinking and attitude to non-animal methods. New approach methodologies (NAMs) emerging more and more often cover a wide range of innovative technologies, including *in vitro* methods using 3D cell cultures, organ-on-a-chip technology, and computational models.

A great support in promoting the development and use of new research approaches is EURL ECVAM - the European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing, which is responsible for the validation of new alternative methods in the EU; it is also the main information point about existing alternative methods to animal experiments, including those just submitted for validation (e.g. TSAR database, DB-ALM repository).

Knowledge of available, validated alternative methods and sources of current knowledge about them encourages researchers to gradually implement new methods that do not require the use of animals in research laboratories.

Emydura subglobosa jako gatunek modelowy

PAULA SKRZYPCZAK, MATEUSZ RAWSKI,
JAN MAZURKIEWICZ*

Katedra Zoologii, Pracownia Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań
*jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: rozród w niewoli, emydura czerwono-brzucha, zwierzę modelowe

Cele wykorzystania zwierząt modelowych obejmują ogólne badania fizjologiczne oraz badania chorób, które można ekstrapolować na szerszą gamę gatunków. Gady są wyjątkowo rzadko stosowane jako organizmy modelowe w badaniach naukowych, co prowadzi do przenoszenia danych lub ogólnych obserwacji z dzikich populacji na osobniki hodowane w niewoli. Ze względu na niewielką adekwatność tego postępowania, istnieje potrzeba tworzenia populacji okazów o znanym pochodzeniu, wyklutych i wychowanych w warunkach laboratoryjnych. Z tego względu, opierając się na wieloletnim doświadczeniu w badaniach nad żółwiami wodno-lądowymi, postanowiono zweryfikować możliwość utrzymania i rozmnażania emydury czerwono-brzuchej (*Emydura subglobosa*) w warunkach laboratoryjnych. Badanie uwzględniło założenie linii hodowlanej *E. subglobosa* jako potencjalnego gatunku modelowego opracowanie metod chowu i hodowli oraz praktycznych diet dla młodych żółwi.

Emydura subglobosa charakteryzuje się szybkim rozwojem młodych osobników oraz wysoką płodnością. Co więcej, dzięki częstemu rozmnażaniu w niewoli i braku ograniczeń w handlu, zwierzęta mogą być legalnie pozyskiwane do hodowli, bez konieczności wykorzystywania osobników odłowionych z natury. Próby założenia laboratoryjnej linii żółwi słodkowodnych podjęto po otrzymaniu dorosłej pary *E. subglobosa* w 2016 roku przez Pracownię Rybactwa Śródlądowego i Akwakultury (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu). Pierwsze pokolenie potomstwa uzyskano w 2017 roku, a drugie w 2023 roku. W każdym pokoleniu do grupy zwierząt dodawano niespokrewnione osobniki, aby uniknąć chowu wsobnego. Ustalono reżimy hodowlane i opracowano diety

bazową do doświadczeń żywieniowych, dającą możliwość wytwarzania w warunkach półtechnicznych - wariant eksturdowany i laboratoryjnych - wariant zestalony żelatyną.

Prawdopodobnie jest to pierwsza próba wytworzenia linii hodowlanej żółwi słodkowodnych do celów naukowych. Cele zostały osiągnięte poprzez pomyślne utrzymanie i rozmnożenie dwóch pokoleń *E. subglobosa*, opracowanie metod chowu i hodowli oraz diet dedykowanych dla tego gatunku.

Literatura:

- [1] Rawski, M., Kierończyk, B., Hetmańczyk, K., Józefiak, D., Skrzypczak, P., & Mazurkiewicz, J. (2024). The first report of the growth performance and environmental sustainability effects of dietary insect meal application on the Jardine River turtle (*Emydura subglobosa*). *Annals of Animal Science*.
- [2] Rawski, M., Kierończyk, B., Skrzypczak, P., & Mazurkiewicz, J. Establishing a Freshwater Turtle (*Emydura subglobosa*) Laboratory Line (FTLL) as a novel model species for research and education. *Animal Science and Genetics*.

Emydura subglobosa as a model species

PAULA SKRZYPCZAK, MATEUSZ RAWSKI,
JAN MAZURKIEWICZ*

Department of Zoology, Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture,
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,
Poznan University of Life Sciences,
Wojska Polskiego 71 C, 60-625 Poznań, Poland
*jan.mazurkiewicz@up.poznan.pl

Keywords: captive breeding, Jardine River turtle, model animal

The aims of the use of model animals include general physiological research and studies of diseases which can be extrapolated to a wider range of species. Reptiles are rarely used as model organisms in scientific research, leading to the transfer of data or general observations from wild populations to captive-bred individuals. Hence, there is a need for a source of specimens of known origin which are laboratory-hatched and raised. For these reasons, drawing from the many years of experience with turtle studies it was aimed to verify the possibility of maintaining and breeding the Jardine River turtle (*Emydura subglobosa*) in laboratory conditions. The study included establishing a breeding colony of *E. subglobosa* as a potential model species and breeding stock for Freshwater Turtle Laboratory Line (FTLL) and to develop maintenance and breeding methods and practical diets for juvenile turtles.

E. subglobosa is characterized by fast juvenile development and high fecundity. Moreover, due to frequent captive breeding and a lack of trade restrictions, animals can legally be obtained for breeding stock, without the need to use animals caught in the wild. Attempts to establish freshwater turtle laboratory line when an adult pair of *E. subglobosa* was received in 2016 by the Laboratory of Inland Fisheries and Aquaculture (Poznań University of Life Sciences). The first generation of offspring was obtained in 2017, and the second in 2023. In each generation, unrelated specimens were added to the animal cohort to avoid inbreeding. Husbandry regimes were established and a basal diet for nutritional experiments was developed, manufactured by two methods: extruded feed and a gelatine-solidified variant.

Therefore, this is the first attempt to develop a freshwater turtle breeding line for scientific purposes. The objectives were met by the successful maintenance and breeding of two generations of *E. subglobosa* and the effective establishment of the FTLL. Breeding and husbandry methodologies, as well as a dedicated diet for this species were also developed.

References:

- [1] Rawski, M., Kierończyk, B., Hetmańczyk, K., Józefiak, D., Skrzypczak, P., & Mazurkiewicz, J. (2024). The first report of the growth performance and environmental sustainability effects of dietary insect meal application on the Jardine River turtle (*Emydura subglobosa*). *Annals of Animal Science*.
- [2] Rawski, M., Kierończyk, B., Skrzypczak, P., & Mazurkiewicz, J. Establishing a Freshwater Turtle (*Emydura subglobosa*) Laboratory Line (FTLL) as a novel model species for research and education. *Animal Science and Genetics*.

Perspektywy dla wdrożenia badań alternatywnych dla toksyczności ostrej dla ryb do celów rejestracyjnych

ROBERT SORNAT¹, DOMINIKA GĄDAROWSKA¹,
JUSTYNA FARON^{1*}

¹ Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Przemysłu Organicznego
Oddział w Pszczynie

*adres do korespondencji: justyna.faron@ipo.lukasiewicz.gov.pl

Słowa kluczowe: Ekotoksykologia, Metody alternatywne, Ryby, Toksyczność ostra

Najczęściej stosowanym testem przeprowadzanym na kręgowcach w ramach badań ekotoksykologicznych jest test toksyczności ostrej na rybach (OECD TG 203), który wykonuje się w celu identyfikacji zagrożeń i oceny ryzyka dla chemikaliów przemysłowych i środków ochrony roślin. Ma on na celu wyznaczenie dawki śmiertelnej dla 50% narażanych ryb (LC50) i wiąże się z wysokim prawdopodobieństwem cierpienia zwierząt.

Istnieją dwie metody alternatywne dla badania toksyczności ostrej na rybach, które, w myśl zasad 3R, mają potencjał do zastąpienia lub ograniczenia testowania toksyczności substancji na zwierzętach kręgowych. Są to badania toksyczności ostrej na embrionach rybich (OECD TG 236) oraz na rybiej linii komórkowej RTgill-W1 (OECD TG 249). Dane literaturowe oraz wyniki badań własnych wskazują na silną korelację wartości LC50 w ostrych testach toksyczności na rybach z wartościami LC50 uzyskanymi w badaniu toksyczności ostrej na embrionach danio przegowanego oraz wartościami EC50 (stężenie powodujące 50% utratę żywotności komórek) w badaniu *in vitro* toksyczności ostrej na rybiej linii komórkowej [1, 2]. Podobna korelacja występuje w przypadku porównania wyników badań toksyczności ostrej na różnych gatunkach ryb [1]. Zastosowane metody z wykorzystaniem analizy regresji wskazują na spójność między wynikami badań *in vivo* i *in vitro*, co w praktyce może być wykorzystane do predykcji toksyczności ostrej dla ryb.

Obecnie brak jest regulacji prawnych pozwalających na wykorzystanie wyników wyżej wymienionych badań alternatywnych do celów rejestracyjnych. Zostały one uwzględnione razem z innymi metodami w projekcie OECD - IA-TA (*integrated approaches to testing and assessment*) opartym na wadze dowodów (*we-*

ight of evidence), jednakże zmiany w sposobie oceny bezpieczeństwa muszą zostać zatwierdzone poprzez zmiany legislacyjne i regulacyjne zanim będą mogły być stosowane w praktyce [3, 4].

Literatura:

- [1] Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ., (2013), Use of sh embryo toxicity tests for the prediction of acute sh toxicity to chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32:1768–1783.
- [2] Sornat R. (2022), Zastosowanie metod alternatywnych do ustalenia parametrów toksyczności dla ryb. Projekt nr 0/22/026/K/ FISHTOX2022.
- [3] Faßbender C., Belanger S., Bichere P., Braunbeck T., Connors K., Halder M., Kienzler A., Langan L., Laue H., Lillicrap A., Moe J., Schirmer K., Scholz S., Stoddart G., Walter-Rohde S., Paparella M. (2021), Current status of the OECD project on IATAs for acute fish toxicity. World Congress presentation, https://www.thepsci.eu/wp-content/uploads/2021/10/2021-World-Congress_Fassbender-et-al._Acute-fish-toxicity-IATA-presentation-2.pdf
- [4] Burden N., Benstead R., Benyon K., Clook M., Green C., Handley J., Harper N., Maynard S. K., Mead C., Pearson A., Ryder K., Sheahan D., van Egmond R., Wheeler J.R., Hutchinson T.H. (2020), Key Opportunities to Replace, Reduce, and Re ne Regulatory Fish Acute Toxicity Tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 39: 2076–2089.

Perspectives for implementation of alternative tests for fish acute toxicity for registration purposes

ROBERT SORNAT¹, DOMINIKA GĄDAROWSKA¹,
JUSTYNA FARON^{1*}

¹ Łukasiewicz Research Network - Institute of Industrial Organic Chemistry
Branch Pszczyna

*correspondence address: justyna.faron@ipo.lukasiewicz.gov.pl

Keywords: Ecotoxicology, Alternative methods, Fish, Acute toxicity

The most commonly used test performed in vertebrates as part of ecotoxicological studies is the fish acute toxicity test (OECD TG 203), which is performed to identify hazards and assess risks for industrial chemicals and plant protection products. The aim of the test is to determine the lethal dose for 50% of exposed fish (LC50) and it involves a high probability of animal suffering.

There are two alternative methods to fish acute toxicity testing which, according to the 3Rs principles, have the potential to replace or reduce toxicity testing of substances in vertebrate animals. These are fish embryos acute toxicity (OECD TG 236) and fish cell line (RTgill-W1) acute toxicity (OECD TG 249). Literature data and our own results show a strong correlation of LC50 values in fish acute toxicity tests with LC50 values obtained in the zebrafish embryos acute toxicity test and EC50 values (concentration causing 50% loss of cell viability) in the *in vitro* fish cell line acute toxicity test [1, 2]. Correlation was similar when comparing the results of acute toxicity tests in different fish species [1]. Applied methods using regression analysis indicate consistency between *in vivo* and *in vitro* test results, which in practice can be used to predict acute toxicity in fish.

Currently there are no regulations allowing the results of the above-mentioned alternative tests to be used for registration purposes. They have been included along with other methods in the OECD project as a part of integrated approaches to testing and assessment (IATA) in weight-of-evidence approach. However, changes in the safety assessment must be adopted through legislative and regulatory changes before they can be applied in practice [3, 4].

References:

- [1] Belanger SE, Rawlings JM, Carr GJ., (2013), Use of sh embryo toxicity tests for the prediction of acute sh toxicity to chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32:1768–1783.
- [2] Sornat R. (2022), Zastosowanie metod alternatywnych do ustalenia parametrów toksyczności dla ryb. Projekt nr 0/22/026/K / FISHTOX2022.
- [3] Faßbender C., Belanger S., Bicheler P., Braunbeck T., Connors K., Halder M., Kienzler A., Langan L., Laue H., Lillicrap A., Moe J., Schirmer K., Scholz S., Stoddart G., Walter-Rohde S., Paparella M. (2021), Current status of the OECD project on IATAs for acute fish toxicity. World Congress presentation, https://www.thepsci.eu/wp-content/uploads/2021/10/2021-World-Congress_Fassbender-et-al._Acute-fish-toxicity-IATA-presentation-2.pdf
- [4] Burden N., Benstead R., Benyon K., Clook M., Green C., Handley J., Harper N., Maynard S. K., Mead C., Pearson A., Ryder K., Sheahan D., van Egmond R., Wheeler J.R., Hutchinson T.H. (2020), Key Opportunities to Replace, Reduce, and Re ne Regulatory Fish Acute Toxicity Tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 39: 2076–2089.

Ból pooperacyjny – czy naprawdę powinniśmy się nim martwić?

DOMINIKA SZKOPEK^{1*}, JAROSŁAW WOLIŃSKI¹

¹ Laboratorium Dużych Modeli Zwierzęcych, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt, Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna, Polska

*adres do korespondencji: d.szkopek@ifzz.pl

Słowa kluczowe: ból okołoperacyjny, ból ostry, czynniki stresogenne, dobrostan zwierząt

Czynniki stresogenne to czynniki przyczyniające się do wystąpienia reakcji stresowej. Do bodźców stresowych zaliczany jest między innymi ból. Przy wydłużonej ekspozycji, braku diagnostyki i wdrożenia odpowiedniego postępowania powoduje on wiele negatywnych konsekwencji dla zdrowia i dobrostanu zwierząt.

Ból ostry związany jest z potencjalnym lub faktycznym uszkodzeniem tkanki. Towarzyszy on między innymi urazowi czy zabiegom operacyjnym. Ból pooperacyjny jest rodzajem bólu ostrego, który powstaje w wyniku śródoperacyjnego przerwania ciągłości tkanek i narządów. Dane statystyczne z medycyny ludzkiej pokazują, że ponad 80% osób poddanych procedurom chirurgicznym doświadcza ostrego bólu pooperacyjnego, przy czym około 75% określa jego nasilenie jako duże lub ekstremalne, a właściwe leczenie bólu pooperacyjnego raportuje mniej niż połowa chorych [1]. Niewłaściwe postępowanie analgetyczne oraz anestezyjologiczne może doprowadzić to tzw. przetrwałego bólu pooperacyjnego. U około 10-50% ludzi poddanych rutynowym zabiegom chirurgicznym ostry ból pooperacyjny przeradza się w ból przewlekły [2].

Prawidłowe postępowanie przeciwbólowe w okresie okołoperacyjnym jest jednym z podstawowych działań klinicznych. Czas rozpoczęcia leczenia przeciwbólowego ma kluczowe znaczenie. Według wielu badań tzw. analgezya z wyprzedzeniem, która obejmuje wielokierunkowe leczenie przeciwbólowe przed i pooperacyjne jest najskuteczniejszym sposobem zmniejszenia bólu pooperacyjnego oraz cechuje się mniejszym pooperacyjnym zużyciem środków przeciwbólowych ze względu na przeciwdziałanie hiperalgezji [3, 4].

Drugą istotną kwestią jest umiejętność oceny natężenia bólu ostrego w okresie pooperacyjnym. Pomocnymi metodami są skale oceny bólu. Obecnie dostępnych jest wiele skal, w tym monoparametryczne lub wieloparametryczne. Ważnym jest, że skal tych nie powinno stosować się do oceny innego rodzaju bólu. Należy również pamiętać, że skale te zostały stworzone dla zwierząt towarzyszących lub ludzi, w związku z czym powinny one służyć jako wzór dla stworzenia własnej skali oceny bólu dla innych gatunków.

Niewłaściwie leczony ból powoduje obniżenie jakości życia i dobrostanu oraz zwiększone ryzyko powikłań pooperacyjnych i powstania przetrwałego bólu. Postępowanie przeciwbólowe stanowi podstawowe działanie terapeutyczne w okresie pooperacyjnym, a umiejętność oceny natężenia bólu jest istotnym elementem codziennej opieki nad zwierzętami.

Literatura:

- [1] Misiólek H., Zajączkowska R., Daszkiewicz A. et al. 2018. Postępowanie w bólu pooperacyjnym 2018. *Anestezjologia Intensywna Terapia*, 50(3), 175-203.
- [2] Kehlet H., Jensen TS, Woolf CJ. 2006. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet*, 367(9522), 1618-1625.
- [3] Vadivelu N., Miltra S., Schermer E., et al. 2014. Preventive analgesia for postoperative pain control: a broader concept. *Local and Regional Anesthesia*, 7, 17-22.
- [4] Katz J., Clarke H., Seltzer Z. 2011. Preventive analgesia: que vadimus? *Anesthesia & Analgesia*, 113(5), 1242-1253.

Postoperative pain – should we really worry about it?

DOMINIKA SZKOPEK^{1*}, JAROSŁAW WOLIŃSKI¹

¹ Large Animal Models Laboratory, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jablonna, Poland

*correspondence address: e-mail: d.szkopek@ifzz.pl

Keywords: perioperative pain, acute pain, stressors, animal welfare

Stressors are factors that contribute to a stress response. Stressful triggers include pain. With prolonged exposure, lack of diagnosis and implementation of appropriate management, it causes many negative consequences for the health and welfare of animals.

Acute pain is associated with potential or actual tissue damage. It accompanies trauma or surgical procedures, among others. Postoperative pain is a type of acute pain that results from intraoperative disruption of tissues and organs. Statistics from human medicine show that more than 80% of people undergoing surgical procedures experience acute postoperative pain, with about 75% describing its severity as severe or extreme, and appropriate postoperative pain management reported by less than half of patients [1]. Inadequate analgesic and anesthetic management can lead to so-called persistent postoperative pain. In about 10-50% of people undergoing routine surgery, acute postoperative pain progresses into chronic pain [2].

Proper pain management in the perioperative period is one of the basic clinical practices. The timing of initiation of analgesic treatment is crucial. According to many studies, so-called preventive analgesia, which includes multidirectional preoperative and postoperative analgesic treatment, is the most effective way to reduce postoperative pain and is characterized by lower postoperative analgesic consumption due to counteracting hyperalgesia [3. 4].

The second important issue is the ability to assess the intensity of acute pain in the postoperative period. Pain assessment scales are helpful methods. Many scales are now available, including monoparametric or multiparametric scales. The important point is that these scales should not be used to assess other types of pain. It is also important to remember that these scales were created for companion animals or humans, and therefore should be used as a model for creating your own pain assessment scale for other species.

Improperly treated pain results in reduced quality of life, welfare, increased risk of postoperative complications and the development of persistent pain. Pain management is the primary therapeutic intervention in the postoperative period, and the ability to assess pain intensity is an essential part of daily animal care.

References:

- [1] Misiólek H., Zajączkowska R., Daszkiewicz A. et al. 2018. Postępowanie w bólu pooperacyjnym 2018. *Anestezjologia Intensywna Terapia*, 50(3), 175-203.
- [2] Kehlet H., Jensen TS, Woolf CJ. 2006. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet*, 367(9522), 1618-1625.
- [3] Vadivelu N., Miltra S., Schermer E., et al. 2014. Preventive analgesia for postoperative pain control: a broader concept. *Local and Regional Anesthesia*, 7, 17-22.
- [4] Katz J., Clarke H., Seltzer Z. 2011. Preventive analgesia: que vadimus? *Anesthesia & Analgesia*, 113(5), 1242-1253.

Sanitas Animalium Pro Salute Hominum, Zarys Historii Medycyny Translacyjnej

ANNA TOMAŃSKA^{1*}

¹ Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
ul. Koźuchowska 1, 51-631 Wrocław.

Instytut Nauk Prawnych PAN, Prawnicze Seminaryjne Doktorskie,
ul. Nowy Świat 72 (Pałac Staszica), 00-330 Warszawa.

*adres do korespondencji: Anna.tomanska@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: biomedycyna, historia, eksperyment

Badania porównawcze na zwierzętach, mające na celu lepsze zrozumienie fizjologii i ontogenezy człowieka, mają swoje korzenie w starożytnej Grecji. Już 2400 lat temu Alcmaeon z Krotonu badał psy, odkrywając związek między mózgiem a inteligencją i sensoryką. W IV wieku p.n.e. Arystoteles prowadził obserwacje embriogenezy i ontogenezy na kurczętach, a w III wieku p.n.e. Erasistratus dowiódł, że serce pełni funkcję pompy tłoczącej krew. Galen z Pergamonu w II wieku n.e. opisał układ sercowo-naczyniowy oraz nerwowy na podstawie badań na żywych zwierzętach. Prace tych pionierów stanowiły fundament dla późniejszych odkryć medycznych. W XVII wieku wiwisekcje budziły kontrowersje, ale również miały swoich obrońców. Filozoficzne i etyczne debaty na temat eksperymentów na zwierzętach doprowadziły do powstania teorii, które uzasadniały te badania. W XVIII i XIX wieku, wraz z profesjonalizacją weterynarii, zrozumienie, że zdrowie zwierząt jest powiązane ze zdrowiem ludzi, stało się kluczowe w kontekście chorób zakaźnych, takich jak gruźlica czy wścieklizna.

XX wiek przyniósł znaczące postępy w biomedycynie dzięki wykorzystaniu modeli zwierzęcych. W 1902 roku William Castle rozpoczął hodowlę myszy do badań genetycznych, a w 1909 roku Clarence Little wyeliminował zmienność myszy laboratoryjnych przez chów wsobny. Kolejne dekady przyniosły przełomowe odkrycia, takie jak skuteczne leczenie cukrzycy insuliną, badania nad depresją i zaburzeniami psychicznymi oraz rozwój technik klonowania, czego przykładem była owca Dolly w 1997 roku. Wprowadzenie myszy transgenicznych oraz sekwencjonowanie genomów myszy i szczura pod koniec XX wieku znacząco wpłynęły na badania genetyczne i biotechnologiczne.

Od lat 70. XX wieku do 2010 roku obserwowano znaczny wzrost wykorzystania myszy w badaniach naukowych, podczas gdy wykorzystanie innych zwierząt, takich jak króliki i koty, malało. Wzrastało również użycie zebrafish jako modelu badawczego. Współczesne badania coraz częściej uwzględniają standardy etyczne wobec zwierząt, a "etyka troski" staje się ważnym uzupełnieniem tradycyjnych teorii moralnych, takich jak utylitaryzm i deontologia. Nowoczesne technologie, takie jak organoidy, mikroprzepływowe chipy organowe oraz symulacje komputerowe i modele matematyczne, rozwijają się dynamicznie, jednak badania na zwierzętach nadal są niezbędne do weryfikacji wyników *in vitro*. Animal studies analizują szerokie zagadnienia związane ze zwierzętami, a nowe nurty filozoficzne i etyczne wpływają na politykę i prawo dotyczące zwierząt. Postęp nauk biomedycznych budzi zarówno obawy, jak i nadzieje społeczne, kładąc nacisk na prawa natury i moralność człowieka. Standardowe teorie moralne są uzupełniane o "etykę troski", zwłaszcza w kontekście zwierząt laboratoryjnych. Pomimo postępu w metodach *in silico* i big data, badania na zwierzętach pozostają niezastąpione w wielu dziedzinach medycyny, co potwierdzają osiągnięcia w leczeniu nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych oraz rozwój nowych terapii i leków.

Literatura:

- [1] A.C. Ericsson, M.J. Crim, C.L. Franklin. A Brief History of Animal Modeling. *Missouri Medicine*, 2013, 110(3): 201-205.
- [2] B.E. Rollin. The Regulation of Animal Research and the Emergence of Animal Ethics: A Conceptual History. *Theoretical Medicine and Bioethics*, 2006, 27: 285-304.
- [3] B.V. Jones. *The History of Veterinary Medicine and the Animal-Human Relationship*. 5m Publishing LTD, 2022.
- [4] D.E. Ingber. Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies? *Advanced Science*, 2020, 7(22).
- [5] D. Jarosz. Zwierzęta jako przedmiot opresji w Polsce w latach 1945-1970; w poszukiwaniu głównych pól badawczych. *Polska. Studia i Materiały*, XIX, 2021, 1944/45 – 1989, 19: 33-56.
- [6] Franco, N.H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals*, 2013, 3, 238-273. <https://doi.org/10.3390/ani3010238>
- [7] J.C. Madden, S.J. Enoch, A. Paini, M.T.D. Cronin. A Review of *In Silico* Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Alternatives to Laboratory Animals*, 2020, 48(4).
- [8] L.B. Kinter, R. DeHaven, D.K. Johnson, J.J. DeGeorge. A Brief History of Use of Animals in Biomedical Research and Perspective on Non-Animal Alternatives. *ILAR Journal*, 2021, 62(1-2): 7-16.

- [9] L.M. Russow. Ethical Implications of the Human-Animal Bond in the Laboratory. *ILAR Journal*, 2002, 43(1): 33-37.
- [10] M. Bosak. Prawo ponadustawowe – nadzieja czy obawa społeczeństw XXI w.? *ΣΟΦΙΑ. Pismo Filozofów Krajów Słowiańskich*, 2: 237-241.
- [11] P. Pasieka. Krytyka i obrona wiwisekcji w XVII wieku. *Ruch Filozoficzny*, 2022, LXXVIII, 2: 55-74.
- [12] R.N. Ram, D. Gadaleta, T.E.H. Allen. The Role of ‘Big Data’ and ‘*In Silico*’ New Approach Methodologies (NAMs) in Ending Animal Use – A Commentary on Progress. *Computational Toxicology*, 2022, 23, 100232.
- [13] W. Surmiak. Sprawozdanie z konferencji Doświadczenia na zwierzętach jako przedmiot refleksji interdyscyplinarnej. *Śląskie Studia Historyczno-Teologiczne*, 2018, 51(1): 236-242.
- [14] A. Elisa. *Animal Ethics and Philosophy: Questioning the Orthodoxy*. Rowman & Littlefield, 2014.
- [15] J.L. Black. Brief History and Future of Animal Simulation Models for Science and Application. *Perspectives on Animal Biosciences. Animal Production Science*, 2014, 54(12): 1883-1895.

Sanitas Animalium Pro Salute Hominum, An Outline of the History of Translational Medicine

ANNA TOMAŃSKA^{1*}

¹ Department of Animal Biostructure and Physiology,
Wrocław University of Environmental and Life Sciences
Kozuchowska Street 1, 51-631 Wrocław.

Institute of Legal Studies, Polish Academy of Sciences, Doctoral Legal Seminars,
Nowy Świat Street 72 (Staszic Palace), 00-330 Warsaw

*correspondence address: anna.tomanska@upwr.edu.pl

Keywords: biomedicine, history, experiment

Comparative studies on animals aimed at better understanding human physiology and ontogeny have their roots in ancient Greece. As early as 2400 years ago, Alcmaeon of Croton studied dogs, discovering the connection between the brain, intelligence, and sensory functions. In the 4th century BCE, Aristotle conducted observations on embryogenesis and ontogeny in chicks, and in the 3rd century BCE, Erasistratus proved that the heart functions as a pump circulating blood. In the 2nd century CE, Galen of Pergamon described the cardiovascular and nervous systems based on studies of living animals. The work of these pioneers laid the foundation for later medical discoveries. In the 17th century, vivisections were controversial but also had their defenders. Philosophical and ethical debates about animal experiments led to the development of theories justifying these studies. In the 18th and 19th centuries, with the professionalization of veterinary medicine, the understanding that animal health is linked to human health became crucial in the context of infectious diseases such as tuberculosis and rabies.

The 20th century brought significant advances in biomedicine through the use of animal models. In 1902, William Castle began breeding mice for genetic research, and in 1909, Clarence Little eliminated variability in laboratory mice through inbreeding. The following decades brought groundbreaking discoveries, such as the effective treatment of diabetes with insulin, research on depression and mental disorders, and the development of cloning techniques, exemplified by the sheep Dolly in 1997. The introduction of transgenic

mice and the sequencing of mouse and rat genomes at the end of the 20th century significantly impacted genetic and biotechnological research.

From the 1970s to 2010, a significant increase in the use of mice in scientific research was observed, while the use of other animals, such as rabbits and cats, declined. The use of zebrafish as a research model also increased. Modern studies increasingly consider ethical standards regarding animals, and the "ethics of care" is becoming an important complement to traditional moral theories such as utilitarianism and deontology. Modern technologies such as organoids, microfluidic organ chips, computer simulations, and mathematical models are developing dynamically, but animal studies are still essential for verifying *in vitro* results. Animal studies analyze broad issues related to animals, and new philosophical and ethical trends influence animal policy and law. The progress of biomedical sciences raises both social concerns and hopes, emphasizing the rights of nature and human morality. Standard moral theories are complemented by the "ethics of care," especially in the context of laboratory animals. Despite advances in *in silico* methods and big data, animal studies remain indispensable in many fields of medicine, as evidenced by achievements in the treatment of cancer, neurodegenerative diseases, and the development of new therapies and drugs.

References:

- [1] A.C. Ericsson, M.J. Crim, C.L. Franklin. A Brief History of Animal Modeling. *Missouri Medicine*, 2013, 110(3): 201-205.
- [2] B.E. Rollin. The Regulation of Animal Research and the Emergence of Animal Ethics: A Conceptual History. *Theoretical Medicine and Bioethics*, 2006, 27: 285-304.
- [3] B.V. Jones. *The History of Veterinary Medicine and the Animal-Human Relationship*. 5m Publishing LTD, 2022.
- [4] D.E. Ingber. Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies? *Advanced Science*, 2020, 7(22).
- [5] D. Jarosz. Zwierzęta jako przedmiot opresji w Polsce w latach 1945-1970; w poszukiwaniu głównych pól badawczych. *Polska. Studia i Materiały*, XIX, 2021, 1944/45 – 1989, 19: 33-56.
- [6] Franco, N.H. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals*, 2013, 3, 238-273. <https://doi.org/10.3390/ani3010238>
- [7] J.C. Madden, S.J. Enoch, A. Paini, M.T.D. Cronin. A Review of *In Silico* Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Alternatives to Laboratory Animals*, 2020, 48(4).
- [8] L.B. Kinter, R. DeHaven, D.K. Johnson, J.J. DeGeorge. A Brief History of Use of Animals in Biomedical Research and Perspective on Non-Animal Alternatives. *ILAR Journal*, 2021, 62(1-2): 7-16.

- [9] L.M. Russow. Ethical Implications of the Human-Animal Bond in the Laboratory. *ILAR Journal*, 2002, 43(1): 33-37.
- [10] M. Bosak. Prawo ponadustawowe – nadzieja czy obawa społeczeństw XXI w.? *ΣΟΦΙΑ. Pismo Filozofów Krajów Słowiańskich*, 2: 237-241.
- [11] P. Pasieka. Krytyka i obrona wiwisekcji w XVII wieku. *Ruch Filozoficzny*, 2022, LXXVIII, 2: 55-74.
- [12] R.N. Ram, D. Gadaleta, T.E.H. Allen. The Role of ‘Big Data’ and ‘*In Silico*’ New Approach Methodologies (NAMs) in Ending Animal Use – A Commentary on Progress. *Computational Toxicology*, 2022, 23, 100232.
- [13] W. Surmiak. Sprawozdanie z konferencji Doświadczenia na zwierzętach jako przedmiot refleksji interdyscyplinarnej. *Śląskie Studia Historyczno-Teologiczne*, 2018, 51(1): 236-242.
- [14] A. Elisa. *Animal Ethics and Philosophy: Questioning the Orthodoxy*. Rowman & Littlefield, 2014.
- [15] J.L. Black. Brief History and Future of Animal Simulation Models for Science and Application. *Perspectives on Animal Biosciences. Animal Production Science*, 2014, 54(12): 1883-1895.

Wpływ owariektomii na parametry ogólnożywniowe i biochemiczne u szczurów

NATALIA WAWRZYŃIAK¹, MAŁGORZATA TUBACKA¹,
JOANNA SULIBURSKA^{*}

¹Katedra Żywności Człowieka i Dietetyki, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

^{*}adres do korespondencji: e-mail: joanna.suliburska@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: owariektomia, estrogen, enzymy wątrobowe, całkowity status antyoksydacyjny

Owariektomia, czyli chirurgiczne usunięcie jajników, jest szeroko stosowanym modelem do badania wpływu deficytu estrogenów na różne parametry fizjologiczne [1]. Celem niniejszego badania była ocena wpływu owariektomii na parametry ogólnożywniowe i biochemiczne u szczurów owariektomizowanych.

W badaniu uczestniczyły 24 szczury szczepu Wistar w wieku 12 tygodni, które podzielono na trzy grupy (po 8 osobników): kontrolna (K), pozornie operowana (S) oraz owariektomizowana (O). Po 9 tygodniach szczury poddano terminacji (poprzez dekapitację), zmierzono masę ciała, pobrano narządy wewnętrzne i krew. W badaniu analizowano masę ciała, względną masę narządów, stężenie parathormonu (PTH), całkowity status antyoksydacyjny (TAS), oraz wybrane wskaźniki krwi (erytrocyty, hemoglobina, hematokryt, leukocyty, limfocyty) i enzymy wątrobowe (ALT, AST) w surowicy.

Owariektomia wywołała znaczące zmiany w parametrach ogólnożywniowych i biochemicznych szczurów. Względna masa serca i nerek wykazywała istotne różnice pomiędzy grupami, z wyższymi wartościami w grupie S. Poziom TAS był istotnie wyższy w grupie O ($12,16 \pm 4,42$ U/ml) w porównaniu do K ($7,51 \pm 1,62$ U/ml) i S ($7,38 \pm 1,74$ U/ml). Liczba leukocytów oraz limfocytów była najwyższa w grupie O. Poziomy ALT i AST były również najwyższe w grupie O ($50,59 \pm 7,65$ U/l i $217,09 \pm 63,97$ U/l). Ponadto, wykazano najwyższą wartość hemoglobiny w grupie O.

Wyższe poziomy enzymów wątrobowych w grupie O sugerują, że deficyt estrogenów może prowadzić do zwiększonego ryzyka zaburzeń wątrobowych

[2]. Wzrost TAS w grupie O może wskazywać na adaptacyjną odpowiedź antyoksydacyjną na stres oksydacyjny wywołany deficytem estrogenów [3].

Owariektomia wpływa na szereg parametrów fizjologicznych i biochemicznych u szczurów, co może mieć implikacje dla zrozumienia skutków deficytu estrogenów u ludzi. Konieczne są dalsze badania, aby lepiej zrozumieć mechanizmy tych zmian i opracować skuteczne strategie interwencyjne.

Projekt finansowany przez NCN (2021/41/N/NZ9/00834).

Literatura:

- [1] Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008 Oct;58(5):424-30. PMID: 19004367
- [2] Kasarinaite A, Sinton M, Saunders PTK, Hay DC. The Influence of Sex Hormones in Liver Function and Disease. *Cells.* 2023 Jun 11;12(12):1604. doi: 10.3390/cells12121604.
- [3] Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007 Aug;28(5):521-74. doi: 10.1210/er.2007-0001.

The influence of ovariectomy on general nutritional and biochemical parameters in rats

NATALIA WAWRZYŃIAK¹, MAŁGORZATA TUBACKA¹,
JOANNA SULIBURSKA^{*}

¹ Department of Human Nutrition and Dietetics,
Faculty of Food Science and Nutrition,
Poznań University of Life Sciences

^{*}correspondence address: e-mail: joanna.suliburska@up.poznan.pl

Keywords: ovariectomy, estrogen, liver enzymes, total antioxidant status

Ovariectomy, i.e. surgical removal of the ovaries, is a widely used model to study the impact of estrogen deficit on various physiological parameters [1]. The aim of this study was to assess the impact of ovariectomy on general nutritional and biochemical parameters in ovariectomized rats.

The study involved 24 Wistar rats aged 12 weeks, which were divided into three groups (8 individuals each): control (K), sham-operated (S) and ovariectomized (O). After 9 weeks, the rats were terminated (by decapitation), body mass was measured, tissues and blood were collected. In the study body weight, relative organ weight, parathyroid hormone (PTH) concentration, total antioxidant status (TAS), and selected blood parameters (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, leukocytes, lymphocytes) and liver enzymes (ALT, AST) in serum were analyzed.

Ovariectomy caused significant changes in the general nutritional and biochemical parameters of rats. The relative weight of the heart and kidneys showed significant differences between groups, with higher values in the S group. The TAS level was significantly higher in the O group (12.16 ± 4.42 U/ml) compared to K (7.51 ± 1.62 U/ml) and S (7.38 ± 1.74 U/ml). The number of leukocytes and lymphocytes was the highest in the O group. ALT and AST levels were also the highest in the O group (50.59 ± 7.65 U/l and 217.09 ± 63.97 U/l). Moreover, the highest hemoglobin value was found in the O group.

Higher levels of liver enzymes in the O group suggest that estrogen deficiency may lead to an increased risk of liver disorders [2]. The increase in TAS in the O group indicates an adaptive antioxidant response to oxidative stress caused by estrogen deficit [3].

Ovariectomy affects a number of physiological and biochemical parameters in rats, which may have implications for understanding the effects of estrogen deficit in humans. Further research is needed to better understand the mechanisms of these changes and to develop effective intervention strategies.

This study was funded by NCN (2021/41/N/NZ9/00834).

References:

- [1] Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008 Oct;58(5):424-30. PMID: 19004367
- [2] Kasarinaite A, Sinton M, Saunders PTK, Hay DC. The Influence of Sex Hormones in Liver Function and Disease. *Cells.* 2023 Jun 11;12(12):1604. doi: 10.3390/cells12121604.
- [3] Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007 Aug;28(5):521-74. doi: 10.1210/er.2007-0001.

Porównanie odpowiedzi terapeutycznej na dwie nowe rozpuszczalne w wodzie pochodne SN-38 w mysim modelu heteroprzeszczepu z nowotworów pochodzących od pacjentów z rakiem jelita

KATARZYNA UNRUG-BIELAWSKA^{1*},
MAGDALENA CYBULSKA-LUBAK¹, EWELINA KANIUGA¹,
ZUZANNA SANDOWSKA-MARKIEWICZ¹,
MAŁGORZATA STATKIEWICZ¹, IZABELA RUMIENŃCZYK¹,
MICHALINA DĄBROWSKA¹, MAGDALENA URBANOWICZ²,
BEATA NAUMCZUK³, LECH KOZERSKI², MICHAŁ MIKULA¹,
JERZY OSTROWSKI⁴

¹ Zakład Genetyki, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
- Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, Polska

² Narodowy Instytut Leków, Warszawa, Polska

³ Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warsaw, Polska

⁴ Katedra i Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii,
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska.

Adres do korespondencji: katarzyna.unrug-bielawska@nio.gov.pl

Słowa kluczowe: PDX, irynotekan, rak jelita grubego, NSG/J, mysie modele w onkologii

Wprowadzenie:

Rak jelita grubego (RJG) jest trzecim najczęściej występującym nowotworem na świecie. W 2018 roku zdiagnozowano 1,8 miliona nowych przypadków i zgłoszono 881 000 zgonów. Te niekorzystne statystyki wynikają głównie z późnego rozpoznania i rozpoczęcia leczenia w zaawansowanej fazie choroby.

Chemioterapeutyczne leczenie RJG opiera się na lekach cytotoksycznych, w tym kombinacji 5-fluorouracylu z leukoworyną i irynotekaniem. Irynotekan jest jednym z ważniejszych leków przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu przerzutowego RJG i innych guzów litych. Jest to lek prekursorowy, działający jako inhibitor topoizomerazy I. Jego aktywny metabolit, 7-etylo-10-hydroksykamptotecyna (SN-38) cechuje się słabą rozpuszczalnością w wodzie, wysoką toksycznością ogólnoustrojową, podatnością na rozwijanie oporności przez komórki nowotworowe oraz ograniczonym działaniem przeciwko

przerzutom. Poszukiwane są modyfikacje, które mogłyby ograniczyć skutki uboczne. Rozpuszczalne w wodzie nowo opracowane pochodne, 7-etylo-9-(N-morfolino)metylo-10-hydroksykamptotecyna (BN-MOA) i 7-etylo-9-(N-metyloamino)metylo-10-hydroksykamptotecyna (BN-NMe), metabolizowane są do SN-38 jedynie w ograniczonym stopniu, wykazując jednocześnie wielokrotnie wyższą aktywność w testach *in vitro* niż irynotekan.

Cel.

Porównano odpowiedzi terapeutyczne na irynotekan i dwie pochodne SN-38, BN-MOA i BN-NMe, z wykorzystaniem heteroprzeszczepów RJG pochodzących od pacjentów (ang. patient-derived xenografts - PDX).

Materiał i metody.

Każdy z 7 PDX hodowano podskórnio u 32 myszy szczepu NSG/J. Związki podawano dootrzewnowo w dawce 40 mg/kg, a zmianę wielkości guzów mierzono dwa razy w tygodniu.

Wyniki.

Potencjał BN-NMe i BN-MOA jako środków terapeutycznych porównano z potencjałem irynotekanu z wykorzystaniem mysich modeli heteroprzeszczepów RJG. Nie zaobserwowano znaczących różnic w masie ciała myszy w grupach kontrolnych i grupach, w których podawano leki. Leczenie irynotekaniem i BN-NMe znacząco opóźniło lub zatrzymało wzrost 5 z 7 PDX. Pochodna BN-MOA wykazała większy potencjał, hamując wzrost 6 z 7 PDX.

Wniosek.

Badania wykazały istotne różnice we wrażliwości na lek w zależności od zastosowanego leczenia oraz modelu PDX. Najwyższą odpowiedź terapeutyczną na wszystkie 3 substancje uzyskano w 2 PDX o najszybszym tempie wzrostu. Wyniki sugerują konieczność uwzględnienia tempa wzrostu oraz charakterystyki PDX podczas doboru modelu.

Literatura:

- 1 Keum N and Giovannucci E: Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16: 713–732, 2019. DOI: 10.1038/s41575-019-0189-8.
- 2 Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69: 7–34, 2019. DOI: 10.3322/caac.21551.

- 3 Kciuk M, Marciniak B and Kontek R: Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci* 21: 4919, 2020. DOI: 10.3390/ijms21144919.
- 4 Guthrie L, Gupta S, Daily J and Kelly L: Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 3: 27, 2017. DOI: 10.1038/s41522-017-0034-1.
- 5 Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G and Sparreboom A: Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7: 2182–2194, 2001.
- 6 Dodds HM, Haaz MC, Riou JF, Robert J and Rivory LP: Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 578–583, 1998.
- 7 Kozerski L, Kawecki R, Naumczuk B, Hyz K, Bocian W, Sitkowski J, Bednarek E, Wiktorska K and Lubelska K: Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use., 2015.
- 8 Cybulska M, Olesinski T, Goryca K, Paczkowska K, Statkiewicz M, Kopczynski M, Grochowska A, Unrug-Bielawska K, Tyl-Bielicka A, Gajewska M, Mroz A, Dabrowska M, Karczmarek J, Paziewska A, Zajac L, Bednarczyk M, Mikula M and Ostrowski J: Challenges in Stratifying the Molecular Variability of Patient-Derived Colon Tumor Xenografts. *Biomed Res Int* 2018: 2954208, 2018. DOI: 10.1155/2018/2954208.

Comparison of therapeutic response to two new solubles in water SN-38 derivatives in a mouse xenograft model from patient-derived tumors with colorectal cancer

KATARZYNA UNRUG-BIELAWSKA^{1*},
MAGDALENA CYBULSKA-LUBAK¹, EWELINA KANIUGA¹,
ZUZANNA SANDOWSKA-MARKIEWICZ¹,
MAŁGORZATA STATKIEWICZ¹, IZABELA RUMIENŃCZYK¹,
MICHALINA DĄBROWSKA¹, MAGDALENA URBANOWICZ²,
BEATA NAUMCZUK³, LECH KOZERSKI², MICHAŁ MIKULA¹,
JERZY OSTROWSKI⁴

¹Department of Genetics, Maria Skłodowska-Curie National Research
Institute of Oncology, Warsaw, Poland

²National Medicines Institute, Warsaw, Poland

³Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

⁴Department of Gastroenterology, Hepatology and Clinical Oncology,
Centre of Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland.

correspondence address: e-mail: katarzyna.unrug-bielawska@nio.gov.pl

Key words: Irinotekan, PDX models, CRC, mouse models in oncology

Colon cancer (CRC) is the most common cancer in the world. In 2018, 1.8 million new cases were diagnosed and 881,000 deaths were reported. These unfavorable statistics result mainly from late diagnosis and initiation of treatment in the advanced phase of the disease.

Chemotherapeutic treatment of CRC is based on cytotoxic drugs, such as combination of 5-fluorouracil, leucovorin and irinotecan. Irinotecan, a pro-drug topoisomerase I inhibitor, is one of the most important anticancer drugs used against metastatic CRC and other solid tumors. Its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) is poorly soluble in aqueous solutions, high systemic toxicity and limited action against drug resistance and metastasis of tumor cells. Structural modifications of SN-38 that would mitigate side effects are searched for. Water-soluble newly formed derivatives, 7-ethyl-9-(N-morpholinyl)methyl-10-hydroxycamptothecin (BN-MOA) and 7-ethyl-9-(N-

-methylamino)methyl-10-hydroxycamptothecin (BN-NMe), are metabolized to SN-38 only to a limited extent while showing higher activity *in vitro* than irinotecan.

Responses to irinotecan and two SN-38 derivatives, BN-MOA and BN-NMe were compared using patient-derived xenografts (PDX).

Each of 7 PDXs was maintained subcutaneously in 32 NSG/J mice. Compounds were administered intraperitoneally at dose 40 mg/kg, and tumor size was measured twice a week.

The potential of BN-NMe and BN-MOA as therapeutic agents was compared to that of irinotecan using mouse xenograft models of CRC. No significant differences were observed in the body weight of mice in the control and drug-treated groups.

Both irinotecan and BN-NMe resulted in growth inhibition of 5 of 7 PDXs. At the same time BN-MOA inhibited growth of 6 of 7 PDX.

The study showed significant differences in drug sensitivity depending on the used compound and the particular PDX model. The highest therapeutic response to all 3 substances was obtained in the 2 PDX with the fastest growth rate. The results emphasize the importance of PDX choice due to its growth rate and characteristics when selecting the model.

References:

- 1 Keum N and Giovannucci E: Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16: 713–732, 2019. DOI: 10.1038/s41575-019-0189-8.
- 2 Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69: 7–34, 2019. DOI: 10.3322/caac.21551.
- 3 Kciuk M, Marciniak B and Kontek R: Irinotecan-Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *Int J Mol Sci* 21: 4919, 2020. DOI: 10.3390/ijms21144919.
- 4 Guthrie L, Gupta S, Daily J and Kelly L: Human microbiome signatures of differential colorectal cancer drug metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes* 3: 27, 2017. DOI: 10.1038/s41522-017-0034-1.
- 5 Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G and Sparreboom A: Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7: 2182–2194, 2001.
- 6 Dodds HM, Haaz MC, Riou JF, Robert J and Rivory LP: Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 578–583, 1998.
- 7 Kozerski L, Kawecky R, Naumczuk B, Hyz K, Bocian W, Sitkowski J, Bednarek E, Wiktorska K and Lubelska K: Derivatives of camptothecin, a method of producing them and their use., 2015.

- 8 Cybulska M, Olesinski T, Goryca K, Paczkowska K, Statkiewicz M, Kopczynski M, Grochowska A, Unrug-Bielawska K, Tyl-Bielicka A, Gajewska M, Mroz A, Dabrowska M, Karczmariski J, Paziewska A, Zając L, Bednarczyk M, Mikula M and Ostrowski J: Challenges in Stratifying the Molecular Variability of Patient-Derived Colon Tumor Xenografts. *Biomed Res Int* 2018: 2954208, 2018. DOI: 10.1155/2018/2954208.

Wykorzystanie zarodków bydłych w alternatywnym doświadczałnictwie

IZABELA WOCLAWEK-POTOCKA*,
ILONA KOWALCZYK-ZIĘBA, DOROTA BORUSZEWSKA

¹ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie,
10-748 Olsztyn, ul. Tuwima 10

* adres do korespondencji: e-mail: i.woclawek-potocka@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: zarodek, krowa, komórki macierzyste

W obecnym czasie metody wspomaganego rozrodu, stosowane w hodowli bydła, to głównie narzędzia służące do genetycznej selekcji zwierząt. Poprzez techniki wspomaganego rozrodu, stosowane na szeroką skalę w krajach rozwiniętych, takie jak: sztuczna inseminacja (szczególnie przy użyciu nasienia seksowanego), MOET (multiple ovulation and embryo transfer), hodowla zarodków *in vitro*, czy klonowanie i inne manipulacje genetyczne, możliwe stało się ciągle doskonalenie wartości genetycznej zwierząt. Z drugiej strony, z gospodarczego punktu widzenia, w Stanach Zjednoczonych oraz w krajach europejskich najbardziej rozwiniętych w dziedzinie hodowli ras mlecznych i produkcji mleka, w tym także powoli i w Polsce, wprowadzenie selekcji genomowej buhajów i krów naturalnie zbiega się w czasie ze znacznym postępowaniem w stosowaniu efektywnych technik wspomaganego rozrodu u bydła. Poza znaczeniem ekonomicznym, dzięki wykorzystaniu nowoczesnych biotechnik rozrodu możliwe stało się również pozyskanie materiału do prowadzenia doświadczeń, ograniczając do minimum liczbę żywych organizmów uczestniczących w doświadczeniach. Metoda produkcji zarodków bydłych *in vitro*, prowadząca do pozyskania materiału do badań w warunkach laboratoryjnych, stosowana w badaniach naukowych, daje bezpośrednie możliwości prowadzenia badań laboratoryjnych nad jakością gamet i zarodków, przedimplantacyjnym rozwojem zarodków, czy charakterystyką i wykorzystaniem embrionalnych komórek macierzystych.

Utilization of bovine embryos in alternative experiments

IZABELA WOCLAWEK-POTOCKA*,
ILONA KOWALCZYK-ZIEBA, DOROTA BORUSZEWSKA

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research, PAS in Olsztyn,
10-748 Olsztyn, Tuwima 10 St.

* e-mail: i.woclawek-potocka@pan.olsztyn.pl

Keywords: embryo, cow, embryonic stem cells

Nowadays, the main techniques for genetic selection of animals are biotechniques of assisted reproduction, used in cattle breeding. Commonly used in industrial countries, assisted reproduction techniques, such as: artificial insemination (especially with sexed semen), MOET (multiple ovulation and embryo transfer), *in vitro* embryo culture, cloning or transgenesis, are continuously facilitating genetic merit of animals. On the other hand, from the economic point of view, in the United States of America as well as in the European countries with the strongest dairy production including also Poland, the introduction of the genetic selection of the dairy sires and cows, correlates in time with rapid development of the effectiveness of assisted reproduction techniques in cattle. Besides the economic significance, utilization of assisted reproduction techniques facilitates gaining biological material for experiments via minimizing the number of alive animals used for experiments. The method of *in vitro* bovine embryo production leads directly to gaining biological samples for laboratory experiments in the area of quality of gametes and embryos, preimplantation embryo development as well as characterization and utilization of embryonic stem cells.

Wykorzystanie zwierząt do celów naukowych w Polsce: lata 2018-2022

WITOLD ŻAKOWSKI*, JUSTYNA MATA CZ, JULIA SZLAMA

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

*witold.zakowski@ug.edu.pl

Słowa kluczowe: danio pręgowany, mysz, neurobiologia, szczur

Szczegółowe statystyki dotyczące wykorzystania zwierząt w badaniach naukowych w Polsce publikowane są każdego roku przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego [1]. Niniejsza analiza dotyczy danych z lat 2018-2022 i obejmuje: całkowitą liczbę zwierząt, najczęściej wykorzystywane gatunki oraz szczegółowe cele badań, do których uutilizuje się zwierzęta w polskich ośrodkach badawczych (i edukacyjnych).

W badanym okresie, w Polsce było wykorzystywanych do celów naukowych średnio 127 tysięcy zwierząt rocznie. Można jednak zaobserwować trend spadkowy, szczególnie mocno zaznaczony w roku 2020 i 2021, w których wykorzystano średnio „jedynie” 110 tysięcy zwierząt. Zdecydowanie najwięcej, bo aż 36% wszystkich zwierząt, brało udział w badaniach nad układem nerwowym, 9% w badaniach dotyczących nowotworów, a 7% zachowania zwierząt (sumarycznie dla badań podstawowych i translacyjnych). Biorąc pod uwagę gatunki zwierząt, największą popularnością wśród naukowców cieszyła się w analizowanym okresie mysz domowa (54% wszystkich zwierząt), na drugim miejscu uplasował się szczur wędrowny (15%), a pierwszą trójkę zamknął danio pręgowany (8%).

Co ciekawe, liczba osobników szczura i danio zrównała się po raz pierwszy w historii w 2022 roku (około 15 tysięcy osobników), co może być wynikiem malejącego zainteresowania pierwszym gatunkiem oraz silnie rosnącego trendu w wykorzystaniu tego drugiego. Szczególnie dotyczy to badań neurobiologicznych, bo to głównie w tym celu wykorzystywany jest w Polsce danio pręgowany. Oprócz wymienionych gatunków, również kura domowa była powszechnie wykorzystywana w badaniach (3%), szczególnie tych związanych z chorobami zwierząt, ich dobrostanem i żywieniem.

Głównymi wnioskami płynącymi z przeprowadzonej analizy są: stopniowy spadek liczby zwierząt wykorzystywanych w nauce, neurobiologia jako dzie-

dzina z największym zapotrzebowaniem na modele zwierzęce oraz rosnąca popularność danio pręgowanego w badaniach naukowych.

Literatura:

[1] <https://www.gov.pl/web/nauka/sprawozdania-kke>

Animal use in research in Poland (2018-2022)

WITOLD ŻAKOWSKI*, JUSTYNA MATA CZ, JULIA SZLAMA

Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology,
University of Gdansk

*witold.zakowski@ug.edu.pl

Key words: mouse, neurobiology, rat, zebrafish

In-depth statistics on the use of animals in scientific research in Poland are published each year by the Ministry of Science and Higher Education [1]. The analysis presented herein concerns the data from the years 2018-2022 and comprises the total number of animals, the most frequently used species, and the specific research purposes for which the animals are utilized in Polish research (and educational) centers.

During the analyzed period, an average of 127,000 animals per year were used for scientific purposes in Poland. However, a decrease may be observed, especially in the years 2020 and 2021, in which 'only' 110,000 animals were used on average. By far the largest number, 36% of all animals, were involved in nervous system research, 9% in cancer research, and 7% in animal behavior (combined for basic and translational research). Considering animal species, the most popular kind among the researchers during the analyzed period was the mouse (54% of all animals), followed by the rat (15%), while the top three were closed by the zebrafish (8%). Interestingly, the number of rat and zebrafish specimens was equal for the first time in history in 2022 (around 15,000 specimens), which may be the result of declining interest in the former species as well as the strongly increasing trend in the use of the latter. This is particularly true for neurobiological research, as the zebrafish is mainly used for this purpose in Poland. Apart from the abovementioned species, also the domestic fowl was widely utilized in research (3%), especially in studies related to animal diseases, welfare and nutrition.

The main conclusions derived from the conducted analysis are: the gradual decrease in the number of animals used in research, neurobiology as a field with the highest demand for animal models, and the growing popularity of zebrafish in scientific research.

References:

[1] <https://www.gov.pl/web/nauka/sprawozdania-kke>

Oddziaływanie składników żywności na układ immunologiczny – badania na zwierzętach

DAGMARA ZŁOTKOWSKA^{1*}

¹ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN

*adres do korespondencji: e-mail: d.zlotkowska@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: alergeny, biologicznie aktywne składniki żywności, białka mleka, limfocyty T, model mysie

Zgodnie z rozporządzeniem UE żywność to „jakiegokolwiek substancje, produkty (przetworzone lub nie) przeznaczone do spożycia przez ludzi”. Żywność to źródło wielu substancji, które codziennie indukują układ immunologiczny błon śluzowych przewodu pokarmowego. Niektóre indukują stan zapalny pociągając za sobą rozwój chorób (np. LPS, alergeny pokarmowe, gluten), lub przeciwdziałają rozwojowi stanów chorobowych wspomagając tym samym działanie układu immunologicznego (np. bioaktywne peptydy, prebiotyki, probiotyki, polifenole).

Biologiczne modele małych gryzoni są jak dotąd jedynym narzędziem do bezpośredniego rozpoznawania mechanizmów oddziaływania składników diety na układ immunologiczny. Wykorzystujemy je do charakterystyki mechanizmów indukcji odpowiedzi na białka pokarmowe, alergii czy tolerancji; do monitorowania i przewidywania potencjału alergennego nowych białek wprowadzanych do żywności (np. białka owadów) czy białek modyfikowanych (np. przez hydrolizę, nieenzymatyczną glikozylację czy fermentację). Mysie modele szczepów WT i wsobnych (np. Balb/c; C57BL/6), genetycznie zmodyfikowanych (np. DB/DB, OB/OB, humanizowane) są szeroko wykorzystywane do badań wielu modeli chorobowych jak np. alergii pokarmowe, otyłość, cukrzyca, celiakia, choroby autoimmunologiczne jak EAE, czy choroby nowotworowe. W badaniach żywności model mysie (lub szczurzy), umożliwia charakterystykę odpowiedzi immunologicznej na podawane składniki (pojedynczo lub w matrycy) w czasie rzeczywistym. To jedyna forma charakterystyki odpowiedzi humoralnej organizmu (profil IgG, IgA, IgE) na białka pokarmowe (szczególnie przy próbie identyfikacji alergenów). Model biologiczny umożliwia monitorowanie profilu limfocytów T (m.in. Th1, Th2,

Th17, limfocyty regulatorowe, NK, DC czy makrofagi) odpowiadających za utrzymanie balansu odpowiedzi immunologicznej nie tylko w odpowiedzi na alergeny pokarmowe. To również jedyny rzeczywisty model eksperymentalny odzwierciedlający biologiczną aktywność składników żywności bezpośrednio poprzez profil limfocytów i panel wydzielanych przez nie cytokin. Stwarza to możliwość ukierunkowanego wykorzystania biologicznie aktywnych składników żywności do wspomagania terapii leczniczych czy spersonalizowanego planu odżywiania grup o określonych wymaganiach żywieniowych (np. diabetycy, alergicy, sportowcy, osoby starsze).

Literatura:

- [1] Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady Z Dnia 28 Stycznia 2002.
- [2] Darewicz i in., Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności, *Żywność Nauka. Technologia Jakość*, 2015, 22(3), 26 – 41.
- [3] Złotkowska et al., J. Immunomodulatory Potential of Probiotics Orally Delivered with -LG to Balb/C Mice. *Clin. Transl. Allergy* 2015 53 2015, 5, 1–2, doi:10.1186/2045-7022-5-S3-P121.
- [4] Wasilewska et al. Yogurt Starter Cultures of *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus Bulgaricus* Ameliorate Symptoms and Modulate the Immune Response in a Mouse Model of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *J. Dairy Sci.* 2019, 102, 37–53, doi:10.3168/jds.2018-14520.
- [5] Złotkowska et al., Differences in Regulatory Mechanisms Induced by Beta-Lactoglobulin and Kappa-Casein in Cow's Milk Allergy Mouse Model-*In Vivo* and *Ex Vivo* Studies. *Nutrients* 2021, 13, e349, doi:10.3390/nu13020349.

Effects of food components on the immune system – animal studies

DAGMARA ZLOTKOWSKA^{1*}

¹ Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences

*Address for correspondence: e-mail: d.zlotkowska@pan.olsztyn.pl

Keywords: allergens, biologically active food ingredients, milk proteins, T lymphocytes, mouse model

According to EU regulations, food is "any substance, product (processed or not) intended for human consumption". Food is a source of many daily substances that induce the mucosal immune system. Some compounds induce inflammation, entailing the development of disease (e.g., LPS, food allergens, gluten), or counteract the development of disease states, thereby supporting the immune system (e.g., bioactive peptides, prebiotics, probiotics, polyphenols).

To date, biological models of small rodents are the only tool for directly identifying the mechanisms by which dietary components affect the immune system. We use them to characterize the mechanisms of induction of responses to dietary proteins (allergy or tolerance), to monitor and predict the allergenic potential of new proteins introduced into food (e.g., insect proteins) or modified proteins (e.g., by hydrolysis, non-enzymatic glycosylation or fermentation). Mouse models of WT and inbred strains (e.g., Balb/c; C57BL/6), genetically modified strains (e.g., DB/DB, OB/OB, humanized) are widely used to study many disease models such as food allergies, obesity, diabetes, celiac disease, autoimmune diseases like EAE, and cancer. In food studies, the mouse (or rat) model allows the characterization of the immune response to administered ingredients (individually or in a matrix) in real time. This model is the only form of characterizing the humoral response (IgG profile, IgA, IgE) to food proteins (especially when identifying allergens). The biological model makes it possible to monitor the profile of T lymphocytes (including Th1, Th2, Th17, regulatory lymphocytes, NK, DC, or macrophages) responsible for maintaining the balance of the immune response, not only in response to food allergens. It is also the only experimental model that directly reflects

the biological activity of food components through the profile of lymphocytes and the panel of cytokines they secrete. The experimentally confirmed biological activity of food ingredients creates the possibility of using them as support in drug therapies or personalized nutrition plans for groups with specific nutritional requirements (e.g., diabetics, allergies, athletes, and older people).

References:

- [1] Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002.
- [2] Darewicz i in., Biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności, *Żywność Nauka. Technologia Jakość*, 2015, 22(3), 26 – 41.
- [3] Złotkowska et al., J. Immunomodulatory Potential of Probiotics Orally Delivered with -LG to Balb/C Mice. *Clin. Transl. Allergy* 2015 53 2015, 5, 1–2, doi:10.1186/2045-7022-5-S3-P121.
- [4] Wasilewska et al. Yogurt Starter Cultures of *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus Bulgaricus* Ameliorate Symptoms and Modulate the Immune Response in a Mouse Model of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *J. Dairy Sci.* 2019, 102, 37–53, doi:10.3168/jds.2018-14520.
- [5] Złotkowska et al., Differences in Regulatory Mechanisms Induced by Beta-Lactoglobulin and Kappa-Casein in Cow's Milk Allergy Mouse Model-*In Vivo* and *Ex Vivo* Studies. *Nutrients* 2021, 13, e349, doi:10.3390/nu13020349.

Pomiar ultradźwięków w pomieszczeniach zwierzętarni a dobrostan zwierząt laboratoryjnych

ANTONINA ŻMUDA^{1*}, DOROTA MYŚLIŃSKA

¹ Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

² Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

*adres do korespondencji: e-mail: a.zmuda.725@studms.ug.edu.pl

Słowa kluczowe: USV, wokalizacja ultradźwiękowa, dobrostan zwierząt

Celem pracy był pomiar emisji ultradźwięków emitowanych przez urządzenia (tzw. zanieczyszczeń ultradźwiękowych) w pomieszczeniach zwierzętarni oraz ich potencjalny wpływ na zachowanie gryzoni w testach behawioralnych. Ultradźwięki zarejestrowano za pomocą urządzenia Avisoft UltraSoundGate 416H i mikrofonu Avisoft-Bioacoustics CM16/CMPA firmy Avisoft Bioacoustics, Niemcy.

Zanieczyszczenia ultradźwiękowe emitowane przez urządzenia elektryczne w zwierzętarni zostały wykryte podczas pomiarów pilotażowych mających na celu ustawienie sprzętu pomiarowego przed właściwymi eksperymentami behawioralnymi w niezależnym badaniu. Zarejestrowano zanieczyszczenia o częstotliwościach od 22 do 96 kHz. Choć emitowanie ultradźwięków przez urządzenia elektryczne jest powszechnym zjawiskiem [1], jest to często pomijany aspekt optymalnego przygotowania środowiska eksperymentalnego.

Zanieczyszczenia ultradźwiękowe uniemożliwiają analizę ultradźwięków emitowanych przez zwierzęta podczas eksperymentów i potencjalnie wpływają na zachowanie szczurów i myszy. Stały szum ultradźwiękowy generowany przez sprzęty elektryczne i elektroniczne może stwarzać ryzyko interferencji fal dźwiękowych, co może wpłynąć na analizę wokalizacji. Wypadkowa częstotliwość dominująca nakładających się dźwięków może nie odzwierciedlać naturalnej częstotliwości dominującej wokalizacji szczurów podczas doświadczenia. Powszechne zanieczyszczenie ultradźwiękowe w zwierzętarniach może negatywnie wpływać na dobrostan zwierząt i należy je ograniczyć. Jednym z rozwiązań jest zastąpienie sztandarowych sufitowych lamp fluorescencyjnych, które emitują ultradźwięki, światłami LED. Ponadto choć ultradźwięki są trudniejsze do wykrycia od dźwięków słyszalnych, są łatwiej tłumione przez

osłony. Mimo że myszy i szczury są w stanie rozróżnić USV od nienaturalnego hałasu ultradźwiękowego generowanego przez urządzenia elektryczne, wciąż potencjalne konsekwencje narażenia na stały hałas ultradźwiękowy mogą być poważne. Zanieczyszczenia ultradźwiękowe przypuszczalnie utrudniają komunikację zwierząt i mogą być szkodliwe dla dobrostanu szczurów i myszy, prowadząc do zwiększonego poziomu agresji lub nawet uniemożliwiając normalne zachowania społeczne [2].

Literatura:

- [1] MacDonald, T., Brudzynski S. M. (2018). Ultrasonic Vocalizations, Their Recording, and Bioacoustic Analysis. W: Brudzynski S. M. (red.): Handbook of Behavioral Neurosciences./Handbook of Ultrasonic Vocalization, Elsevier, 25, 7-19.
- [2] Parker, A., Hobson, L., Bains, R., Wells, S., & Bowl, M. (2022). Investigating audible and ultrasonic noise in modern animal facilities. *F1000Research*, 11, 651.

Measurement of ultrasounds in animal houses and the welfare of laboratory animals

ANTONINA ŻMUDA^{1*}, DOROTA MYŚLIŃSKA

¹ Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology,
University of Gdańsk

² Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology,
University of Gdańsk

*correspondence address: e-mail: a.zmuda.725@studms.ug.edu.pl

Keywords: USV, ultrasonic vocalisation, animal welfare

The aim of this study was to measure ultrasounds emitted by electrical equipment (so-called ultrasonic pollutants) in the animal house and their potential impact on rodent behaviour in behavioural tests. Ultrasound was recorded using an Avisoft UltraSoundGate 416H and an Avisoft-Bioacoustics CM16/CMPA microphone from Avisoft Bioacoustics, Germany.

Ultrasonic pollutants emitted by electrical equipment in the animal house were detected during pilot measurements to set up the recording equipment prior to behavioural experiments in an independent study. Contaminants with frequencies ranging from 22 to 96 kHz were recorded. Although ultrasonic emission from electrical equipment is a common phenomenon [1], it is an often overlooked aspect of optimal experimental environment set up.

Ultrasonic pollution disables proper analysis of ultrasounds emitted by animals during experiments and potentially affects the behaviour of rats and mice. Constant ultrasonic noise generated by electrical and electronic equipment may pose a risk of sound wave interference, which may affect the analysis of vocalisations. The resulting dominant frequency of the overlapping sounds may not reflect the natural dominant frequency of rats' vocalisation during the experiment. Widespread ultrasonic contamination in animal houses can adversely affect animal welfare and should be reduced. One solution is to replace pervasive overhead fluorescent lights, which emit ultrasound, with LED lights. In addition, although ultrasounds are harder to detect than audible sounds, they are more easily attenuated by shielding. Although mice and rats are able to distinguish between USV and unnatural ultrasonic noise gene-

rated by electrical appliances, the potential consequences of exposure to constant ultrasonic noise can still be serious. Ultrasonic pollution presumably impairs animal communication and can be detrimental to the welfare of rats and mice, leading to increased levels of aggression or even preventing normal social behaviour [2].

References:

- [1] MacDonald, T., Brudzynski S. M. (2018). Ultrasonic Vocalizations, Their Recording, and Bioacoustic Analysis. W: Brudzynski S. M. (red.): Handbook of Behavioral Neurosciences, Handbook of Ultrasonic Vocalization, Elsevier, 25, 7-19.
- [2] Parker, A., Hobson, L., Bains, R., Wells, S., & Bowl, M. (2022). Investigating audible and ultrasonic noise in modern animal facilities. *F1000Research*, 11, 651.

SPIS TREŚCI / CONTENTS

ARTI AHLUWALIA

The 3Rs in theory and practice 9

ALEKSANDRA BARTELIK, ALENA KUBÁTOVÁ, LUCIE ŠIMKOVÁ, MILADA ŠIROVÁ

Cesarskie cięcie jako optymalna forma rederywacji
i utrzymania hodowli SPF myszy laboratoryjnej 11

Caesarean section as an optimal form of rederivation
and maintenance of laboratory mouse colony on SPF level 13

KAMILA BOBREK

Zasady 3R – wykorzystanie bezkręgowców w badaniach naukowych . . . 15

The 3 Rs – the use of invertebrates in scientific research 17

PROF. TIZIANA A.L. BREVINI, PHARM D PHD

Trójwymiarowe modele komórkowe do badań 3R 19

3D cell models for 3R research 20

ELŻBIETA BUDZIŃSKA-WRZESIEŃ, ROBERT WRZESIEŃ

Znieczulenie i metody uśmierzenia bólu u miniaturowej świnki
getyńskiej (Göttingen Minipig) 21

Anaesthesia and pain-relieving methods in the Göttingen Minipig 23

KATARZYNA BURLIKOWSKA, JOANNA BOGUSIEWICZ, BOGUMIŁA KUPCEWICZ,

KAROL JAROCH, IGA STRYJAK, BARBARA BOJKO

Profil lipidomiczny narządów u myszy szczepów C57BL/6, BALB/c i CD1 . . 25

Lipidomic profile of organs in C57BL/6, BALB/c and CD1 mice 27

PIOTR CZYŻOWSKI

Problemy w badaniach dobrostanu zwierząt dziko żyjących 29

Problems in wildlife welfare research 31

EWA BARBARA DEJNAKA, BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ, ALEKSANDRA PAWLAK	
Pies jako model w badaniach porównawczych <i>in vitro</i> nad nowotworami hematopoetycznymi u ludzi	33
The dog as a model for comparative <i>in vitro</i> studies of human hematopoietic tumors	35
BARTOSZ FOTSCHKI, KATARZYNA OGNIK, MILENA JUŚKIEWICZ, IRENA GODYCKA-KŁOS, DOROTA NAPIÓRKOWSKA, EWELINA CHOLEWIŃSKA, ANNA STĘPNIOWSKA, PRZEMYSŁAW ZDUŃCZYK, JERZY JUŚKIEWICZ	
Wpływ błonnika pokarmowego i nanocząsteczek miedzi na metabolizm wątrobowy. Badania na modelu szczura Wistar	37
Effect of dietary fiber and copper nanoparticles on hepatic metabolism. Studies on a Wistar rat model	39
ALEKSANDRA GAJEWSKA, KATARZYNA MARSZAŁEK, MAŁGORZATA DOMŻAŁSKA, SANDOR KANTOR, EWA SOKOŁOWSKA	
Znaczenie opieki przed i pooperacyjnej w kontekście przeżywalności i dobrostanu gryzoni laboratoryjnych	41
Importance of pre- and post-operative regimen in the survival and welfare of laboratory rodents	43
ANNA GALIŃSKA, JAGODA PŁACZKIEWICZ, KATARZYNA KORDECKA, KAROLINA SARAN, ANNA POSŁUSZNY, ANDRZEJ T. FOIK	
Wzmocnienie funkcji wzrokowych u myszy z zaburzeniami widzenia leczonych opsynami	45
Enhancement of visual functions in visually impaired mice treated with opsins	47

PAWEŁ WRÓBLEWSKI, RAFAŁ MACIASZEK, NORBERT GAŁKA	
Niechciany gość z Dalekiego Wschodu: inwazja niepożądanego gatunku czebaczka amurskiego <i>Pseudorasbora parva</i> (Schlegel, 1842), w Warszawie	49
Unwanted guest from the Far East: Invasion of the undesirable species stone moroko <i>Pseudorasbora parva</i> (Schlegel, 1842) in Warsaw	50
NORBERT DANIEL GAŁKA, MARTA GAJEWSKA, WIESŁAW ŚWIDEREK	
Mysz laboratoryjna jako zwierzę modelowe w procesie kształcenia studentów uczelni o profilu biologiczno-przyrodniczym	51
Laboratory mouse as a model animal in the education process of students of biological and natural science universities	53
JULIA RĘKAS, NORBERT DANIEL GAŁKA, MARTA GAJEWSKA	
Wpływ normalizacji miotów na masę ciała odsadzonej i dorosłej myszy na przykładzie linii ciężkiej i lekkiej	55
The influence of litter normalization on the body weight of weaned and adult mice on the example of the heavy and light lines	57
JAKUB BALTAZAR BADZIUKIEWICZ, RAFAŁ MACIASZEK, NORBERT GAŁKA	
Występowanie problematycznych gatunków żółwi na rynku zoologicznym w Polsce	59
Occurrence of problematic turtle species in the pet trade in Poland	61
OLGA GEWARTOWSKA, MAGDALENA GRAL, MAGDALENA GÓRA	
Praktyczne aspekty wyprowadzania i hodowli ryb zmodyfikowanych genetycznie	63
Practical aspects of generation and breeding of genetically modified zebrafish lines	64
GRZEGORZ GÓRECKI	
Ochrona bioróżnorodności – odpowiedzialność naukowców czy społeczeństwa?	65
Biodiversity protection – responsibility of scientists or society?	68

KATARZYNA GRUSZKA, INGA MRZYK, JUSTYNA FARON	
Aktualny status projektu OECD dotyczącego zintegrowanego podejścia do badań i oceny toksyczności ostrej dla ryb (IATA)	71
Current status of the OECD project on Integrated Approach to Testing and Assessment of acute toxicity in fish (IATA)	73
KATARZYNA JAWORSKA, KATARZYNA OGNIK, BARTOSZ FOTSCHKI, JOANNA FOTSCHKI, ALEKSANDRA MARZEC, PRZEMYSŁAW ZDUŃCZYK, ANNA STĘPNIOWSKA, EWELINA CHOLEWIŃSKA, ŁUCJA BRUZAN, JERZY JUŚKIEWICZ	
Pektyna, inulina i psyllium łagodzą hamujący wpływ nanocząstek miedzi na procesy fermentacyjne w kale szczura	75
Dietary pectin, inulin and psyllium mitigate the inhibitory effects of copper nanoparticles on fecal fermentation processes in rats	77
MIROŚLAW KALICKI	
Ból u zwierząt w zoo	79
Pain in zoo animals	81
URSZULA KARCZMARCZYK, EWA LASZUK, MILENA WÓJCICKA, MAGDALENA FRĄCZYK, PIOTR GARNUSZEK	
Udoskonalenie klatek metabolicznych dla gryzoni	83
Metabolic cage improvement for rodents	84
JUSTYNA KNOSAŁA, MAGDALENA AKOLIŃSKA	
Aspekty prawne relacji wnioskodawców z lokalnymi komisjami etycznymi ds. doświadczeń na zwierzętach. Wnioskowanie o udzielenie zgody na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach	85
ANNA DIANA KONONIUK, ANNA KORZEKWA	
Zwierzęta wolno żyjące w badaniach naukowych – meta-analiza obszarów badawczych	86
Wild animals in scientific research – meta-analysis of research areas	88
RONALD KOOP	
Systemy obrazowania IVIS© – legendarna wydajność obrazowania optycznego <i>in vivo</i>	90
The IVIS© imaging systems – legendary performance for optical imaging <i>in vivo</i>	91

RONALD KOOP

Obrazowanie przedkliniczne – wszechstronna technologia monitorowania odpowiedzi komórkowych i molekularnych mechanizmów choroby *in vivo* 92

Preclinical Imaging – A versatile technology to monitor cellular responses and molecular mechanisms of disease *in vivo* 93

RONALD KOOP

Nowatorski system obrazowania ultradźwiękowego Vega® – pierwszy na świecie niewymagający użycia rąk, przedkliniczny, zautomatyzowany system ultradźwiękowy o dużej przepustowości 94

The Novel Vega® Ultrasound Imaging System – The world’s first hands-free, preclinical automated high-throughput ultrasound system . . . 95

ANNA KORZEKWA

Czynniki abiotyczne i biotyczne determinujące przebieg funkcji rozrodczych u wolno żyjących roślinożerców 96

Abiotic and biotic factors determining the course of reproductive function in wild herbivores 99

RADOSŁAW KAJETAN KOWALSKI

Dobrostan ryb w badaniach naukowych 101

Fish welfare in scientific research 103

LEK. WET. ROBERT M. KRACZKOWSKI

Jak rozpoznawać i leczyć ból u różnych gatunków zwierząt? 105

IZABELA PATRYCJA KRAUSE

Resocjalizacja małp pochodzących z laboratoriów medycznych, na przykładzie grupy makaków królewskich (*Macaca mulatta*) w Gdańskim Ogrodzie Zoologicznym 107

Resocialization of monkeys from medical laboratories, based on the example of a group of Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*) in the Gdańsk Zoo 109

KATARZYNA KRZYWDA, ARTUR ŚWIERCZEK, ELŻBIETA WYSKA	
Wpływ wieku i płci na farmakokinetykę meloksykamu u szczurów	111
Effect of age and sex on the pharmacokinetics of meloxicam in rats	113
EDYTA A. BAUER, DOMINIKA KUŁAJ, JOANNA POKORSKA, SEBASTIAN SAWICKI	
Analiza polimorfizmu genu osteopontyny oraz jego związku z opornością na ketozę u bydła mlecznego	115
Gene association analysis of an osteopontin polymorphism and ketosis resistance in dairy cattle	117
ŁUKASZ MAJEWSKI, MATYLDA MACIAS, ALEKSANDRA SZYBIŃSKA,	
JACEK KUŹNICKI, MAŁGORZATA (WIWEGER) KORZENIOWSKA	
Ultrastrukturalne badania choroby Niemann-Picka typu C przy użyciu modelu zebrafish	119
Ultrastructural insights into Niemann-Pick type C disease using a zebrafish model	121
JAN MAZURKIEWICZ, MATEUSZ RAWSKI, KRZYSZTOF FLORCZYK,	
JAN BANASZAK, PAULA SKRZYPCZAK, MARCIN WIŚNIEWSKI	
Systemy eRAS w badaniach naukowych modelowych gatunków ryb oraz akwakulturze zachowawczej	123
eRAS systems in scientific research of model fish species and conservation aquaculture	125
MAREK MICHAŁOWSKI	
High Content Screening – standaryzacja, automatyzacja i przepustowość w badaniach podstawowych i przedklinicznych jako alternatywna metoda do badań <i>in vivo</i>	127
High Content Screening – standardization, automation and throughput in basic and preclinical research as an alternative method to <i>in vivo</i> research	128
MATYLDA BARBARA MIELCARSKA	
Mysie modele choroby Alzheimerera	129

ANITA MIKOŁAJCZYK	
Potencjał lipopolisacharydów i standardy strategii badawczych	131
The potential of lipopolysaccharides and standards of research strategies	135
BOŻENA OBMIŃSKA-MRUKOWICZ	
Hiperalghezja indukowana opioidami istotną barierą skutecznej terapii przeciwbólowej	139
Opioid-induced hyperalgesia a significant barrier to effective pain therapy	144
OGRODOWCZYK ANNA, ZŁOTKOWSKA DAGMARA, MARKIEWICZ LIDIA, WRÓBLEWSKA BARBARA	
Rola białek bakterii fermentacji mlekowej w regulacji odporności – badania modelowe	149
The role of lactic acid bacteria proteins in the regulation of immunity – model research	151
WOJCIECH NIŻAŃSKI, AGNIESZKA PARTYKA	
Możliwości zastosowania technik wspomaganego rozrodu w ochronie bioróżnorodności	153
Possibilities of using Assisted Reproductive Techniques in biodiversity conservation programs	156
ALEKSANDRA PAWLAK	
Organoidy – alternatywa dla wykorzystywania zwierząt w badaniach translacyjnych	159
Organoids: an alternative to the use of animals in translational research	161
MEENA KUMARI PALANI KUMAR, PRAKASH MOTIRAM HALAMI, MUTHUKUMAR SERVA PEDDHA, DOROTA WRONKA, SABRINA GEISBERGER, ARIANA RAUCH, ANNA KARLIK, THEDA ULRIKE PATRICIA BAROLOMAEUS, ULRIKE LÖBER, NICOLA WILCK, STEFAN KEMPA, ARASH HAGHIKIA, SOFIA K FORSLUND, LAJOS MARKÓ, LUKASZ PRZYBYL	
Regulacja metabolizmu cholesterolu jelitowego zależna od układu odpornościowego w mysim modelu ApoE-KO	163
Immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism in the ApoE-KO mouse model	165

ERYKA PANKOWSKA, TATIANA WOJCIECHOWSKA, MACIEJ GOGULSKI, LIDIA RADKO	
Działanie toksyczne tiamuliny w ludzkich komórkach nerki – badania <i>in vitro</i>	167
Toxicity action of tiamulin in human kidney cells – <i>in vitro</i> study	169
MATEUSZ RAWSKI, PAULA SKRZYPCZAK, JAN MAZURKIEWICZ	
Konwencja Waszyngtońska (CITES), rozporządzenia Unii Europejskiej i przepisy krajowe – znaczenie w badaniach na zwierzętach	171
Washington Convention (CITES), European Union and Polish regulations – the role in research with animals	173
JOANNA ROSZAK	
Metody alternatywne do badań na zwierzętach	175
Alternative methods to animal testing	177
PAULA SKRZYPCZAK, MATEUSZ RAWSKI, JAN MAZURKIEWICZ	
<i>Emydura subglobosa</i> jako gatunek modelowy	178
<i>Emydura subglobosa</i> as a model species	180
ROBERT SORNAT, DOMINIKA GĄDAROWSKA, JUSTYNA FARON	
Perspektywy dla wdrożenia badań alternatywnych dla toksyczności ostrej dla ryb do celów rejestracyjnych	182
Perspectives for implementation of alternative tests for fish acute toxicity for registration purposes	184
DOMINIKA SZKOPEK, JAROSŁAW WOLIŃSKI	
Ból pooperacyjny – czy naprawdę powinniśmy się nim martwić?	186
Postoperative pain – should we really worry about it?	188
ANNA TOMAŃSKA	
<i>Sanitas Animalium Pro Salute Hominum,</i> Zarys Historii Medycyny Translacyjnej	190
<i>Sanitas Animalium Pro Salute Hominum,</i> An Outline of the History of Translational Medicine	193

NATALIA WAWRZYŃIAK, MAŁGORZATA TUBACKA, JOANNA SULIBURSKA	
Wpływ owariektomii na parametry ogólnożywniowe i biochemiczne u szczurów	196
The influence of ovariectomy on general nutritional and biochemical parameters in rats	198
KATARZYNA UNRUG-BIELAWSKA, MAGDALENA CYBULSKA-LUBAK, EWELINA KANIUGA, ZUZANNA SANDOWSKA-MARKIEWICZ, MAŁGORZATA STATKIEWICZ, IZABELA RUMIEŃCZYK, MICHALINA DĄBROWSKA, MAGDALENA URBANOWICZ, BEATA NAUMCZUK, LECH KOZERSKI, MICHAŁ MIKULA, JERZY OSTROWSKI	
Porównanie odpowiedzi terapeutycznej na dwie nowe rozpuszczalne w wodzie pochodne SN-38 w mysim modelu heteroprzeszczepu z nowotworów pochodzących od pacjentów z rakiem jelita	200
Comparison of therapeutic response to two new solubles in water SN-38 derivatives in a mouse xenograft model from patient-derived tumors with colorectal cancer	203
IZABELA WOCLAWEK-POTOCKA, ILONA KOWALCZYK-ZIĘBA, DOROTA BORUSZEWSKA	
Wykorzystanie zarodków bydłęcych w alternatywnym doświadczałnictwie	206
Utilization of bovine embryos in alternative experiments	207
WITOLD ŻAKOWSKI, JUSTYNA MATA CZ, JULIA SZLAMA	
Wykorzystanie zwierząt do celów naukowych w Polsce: lata 2018-2022	208
Animal use in research in Poland (2018-2022)	210
DAGMARA ŻŁOTKOWSKA	
Oddziaływanie składników żywności na układ immunologiczny – badania na zwierzętach	211
Effects of food components on the immune system – animal studies	213
ANTONINA ŻMUDA, DOROTA MYŚLIŃSKA	
Pomiar ultradźwięków w pomieszczeniach zwierzętarni a dobrostan zwierząt laboratoryjnych	215
Measurement of ultrasounds in animal houses and the welfare of laboratory animals	217

animavivari

01-981 Warszawa
ul. Arrasowa 14

tel. 22 425 51 19
tel. 22 435 62 44

Anima Vivari - wyłączny przedstawiciel
światowych wiodących producentów
wyposażenia zwierzętarni.

anima-it@anima-it.pl

www.anima-vivari.pl

 **TECNIPLAST**
kompleksowe wyposażenie zwierzętarni



 **matachana**
autoklawy

 **minerve**
EQUIPEMENT VÉTÉRIINAIRE
urządzenia do anestezji i eutanazji

iwat
wyposażenie zmywalni
dekontaminacja i logistyka



animavivari

01- 981 Warszawa
ul. Arrasowa 14

tel. 22 425 51 19
tel. 22 435 62 44

KOMPLEKSOWE WYPOSAŻENIE ZWIERZĘTARNI

biuro@vivari.waw.pl

www.anima-vivari.pl



Pasze i ściółki



**Modele zwierzęce
i transport zwierząt**



**Pletryzmografia
i telemetria**

anibio

**Oprogramowania
do zarządzania
zwierzętarnią**

**w służbie nauce
z myślą o zwierzętach**

**i wiele innych
produktów...**

budimex

Budimex - pozycja na rynku

- Lider rynku budowlanego w Polsce obecny na rynku od 1968 roku
- Generalny wykonawca inwestycji
- Największa spółka w ramach Grupy Budimex notowana na Giełdzie Papierów Wartościowych w Warszawie



Segment budowlany

Budownictwo ogólne

Budownictwo infrastrukturalne

Budownictwo kolejowe

Budownictwo Energetyczne i Przemysłowe



Po pierwsze bezpieczeństwo!



Skład Grupy Budimex

- Do Grupy należą spółki świadczące usługi: budowlane, deweloperskie, z zakresu facility management, projektowe, laboratoryjne, z zakresu montażu konstrukcji stalowych oraz urządzeń głównie dla przemysłów cementowo-wapienniczego, energetycznego, hutniczego, chemicznego

Spółeczna odpowiedzialność biznesu w Budimex



budimex

Szpitaly i laboratoria

Szpital Kliniczny w
Białymstoku



Mondelēz Centrum Badawcze

Wydział Chemii UJ



MSW Drewnica



Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej

Szpital Zespolony w Toruniu





Sterivap HP IL



Sterylizatory parowe i parowo-powietrzne
dla przemysłu i farmacji

www.mmmpolska.com

MMM. Protecting Human Health.



Unisteri HP IL for laboratories

Kompaktowy autoklaw dla każdego typu laboratorium

www.mmmpolska.com

MMM. Protecting Human Health.



PRO-ENVIRONMENT
think future

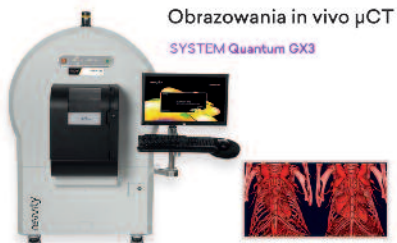
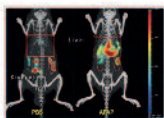
revvity

Oferujemy najlepsze rozwiązania
na rynku w zakresie:



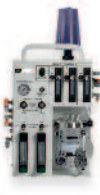
Obrazowania in vivo
optycznego (2D, 3D, BLI,
FLI, X-ray, μ CT)

SYSTEMY IVIS Spectrum



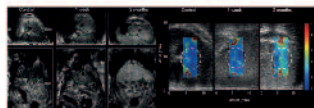
Obrazowania in vivo μ CT

SYSTEM Quantum GX3



Obrazowania in vivo USG

SYSTEM USG VEGA



Pro-Environment Polska Sp. z o.o.
ul. Zwitki i Wigury 101, 02-089 Warszawa (CNBCh)
NIP 5213277598

+48 22 310 88 00
biuro@pepolska.pl

Autoryzowany dystrybutor marek:



Zobacz więcej:





Complete Care
Competence

Securing Your Research

Nazwa lokalny dystrybutor:

JRS Fibers for Life.

RETENMAIER POLSKA SP. Z O.O.
+48 601 424 787
dominik.domszala@jrs.pl

ENRICHMENT

BEDDING

SERVICES

DIETS

CUSTOM
DIETS

Twój wszechstronny partner
w dziedzinie zwierząt laboratoryjnych

Poczuj różnicę: kompleksowe rozwiązania pielęgnacyjne
w Twojej pracy naukowej. Skorzystaj z naszego
doświadczenia w dziedzinie zwierząt laboratoryjnych.

Quality. Reliability. SAFETy.



Diets
Custom Diets
Bedding
Enrichment
Services



DIETY



DIETY
INDYWIDUALNE



ŚCIOŁKI



WZBOGACENIA



Fibers for Life.

J. RETTENMAIER & SÖHNE GMBH + CO KG
Rosenberg, (Germany)

Phone +49 7967 152-434
sales@safe-lab.com

www.safe-lab.com



ALAB bioscience jest laboratorium **grupy ALAB** z szeroką ofertą w zakresie nauk o życiu. Wykorzystując doświadczenie ALAB laboratora i ALAB plus, stworzyliśmy laboratorium wspierające placówki naukowe oraz jednostki badawczo-rozwojowe w ich projektach.

Oferta nasze badań obejmuje patologię eksperymentalną; toksykologiczną, biologię i diagnostykę molekularną, genomikę, proteomikę, farmakotoksykokinetykę, monitoring zdrowia zwierząt oraz ogólną diagnostykę laboratoryjną. Wspieramy również naszych partnerów w organizacji i przeprowadzaniu testów *in vivo*.

Oferta:

- Patologia w Dobrej Praktyce Laboratoryjnej (GLP)
- Patologia toksykologiczna, farmaceutyczna i środowiskowa
- Ogólna diagnostyka laboratoryjna
- Farmakokinetyka, Toksykokinetyka, Metabolomika
- Transkryptomika i genotypowanie - Sekwencjonowanie i Biomark HD
- Proteomika – Olink oraz chromatografia i spektrometria
- Analizy mikrobiomu i mikrobiologiczne
- Monitoring Zdrowia Zwierząt FELASA
- Badania przewodu pokarmowego i badanie pasz



Transpharmation is a **contract research organisation** led by scientists. Recognised by drug developers worldwide for researching and delivering life-changing medicines, science will always remain our passion. We specialise in cross-species and cross-therapeutic areas in translational pharmacology with **AAALAC** accreditation. Our breadth of neuroscience expertise means clients are able to benchmark their compounds against clinical gold standards in well validated behavioural and molecular assays and includes **PK & non-GLP safety, Pain, Epilepsy, Depression & Anxiety, EEG, Aging, Neurodegenerative Disorders, Biomarkers, Cognitive Disorders and more...**

We are committed to on-time data delivery and flexibility whether for gold standard models to innovative customized platforms, our research services deliver the critical pieces of information needed to realize the full potential of your preclinical assets.

<https://www.transpharmation.com/>

LABORATORYJNE WSPARCIE NAUKI

- Sektor Laboratorium Vetlab będący odpowiedzią na potrzeby naukowców
- Wsparcie dedykowane ośrodkom badawczym, firmom biotechnologicznym, farmaceutycznym, paszowym a także prywatnym i państwowym instytucjom naukowym
- Szeroki asortyment badań i metod diagnostycznych dostosowanych dla potrzeb nauki

DLACZEGO VETLAB FOR SCIENCE?

Nasze mocne strony



Doradca naukowy
dedykowany Twojemu
projektowi badawczemu



Szybki i nieodpłatny odbiór
próbek



Dostosowanie pakietu badań
do potrzeb naukowych i
możliwości finansowych



Wysyłka wyników
w wygodnej formie



Dostarczanie niezbędnych
materiałów zużywalnych



Forma rozliczeniowa
dostosowana do założeń
projektowych

Skontaktuj się z nami!



DORADCA NAUKOWY DS. PROJEKTÓW BADAWCZYCH
lek. wet. Jolanta Szlapka-Kosarzewska
+48 570 016 266
jolanta.szlapka-kosarzewska@vetlab.pl

ANIMA LAB

Duży wybór rozwiązań i kompleksowa oferta

- Projektowanie i kompleksowe wyposażanie zwierzętarni
- Serwis urządzeń, naprawy gwarancyjne i pogwarancyjne
- Stałe dostawy pasz i ściółek
- Modele zwierząt laboratoryjnych z transportem
- Systemy do badań *in-vivo* i *in-vitro*

Steelco Member Group/Member

Allentown.
Improving life - in in vivo DNA

nordic
labtech

adrona
LABORATORY SYSTEMS

altromin

TAPVEI®
Quality answers in aspect

charles river

The Jackson
Laboratory

ibidi.
making life science

TSE
systems

Kent Scientific
CORPORATION

ub ugo basile®
FROM CONCEPTS INTO INSTRUMENTS

ADINSTRUMENTS
making science smart

ANIMA LAB

We help to discover new possibilities

BECOME A KEY TO DISCOVERY

What we do

Ryvü Therapeutics is a clinical-stage drug discovery and development company focused on novel small-molecule therapies that address emerging targets in oncology. We push the boundaries of self-development and the knowledge of cancer biology to discover and develop a new generation of oncology therapies to help patients worldwide.



Our Values



Why us

- Modern laboratories
- World-class scientists and professionals
- Training programs and defined career path
- Summer Internship Program



Join a team

of passionate Ryvers and improve the lives of cancer patients! We're seeking people who will play a crucial role in our drug discovery efforts and contribute to developing more effective medicines.



Grow with us

- chemistry
- biology
- DMPK
- preclinical pharmacology
- clinical
- operations

Contact us

careers@ryvu.com
www.ryvu.com/careers





Your partner of choice
in integrated research

Join our team of #SelvitaSuperHeroes

Selvita is a **global integrated service provider** with laboratories in **Poland** (Krakow, Poznan, and Wroclaw), **Croatia** (Zagreb), and offices in **Cambridge, UK**, as well as the **Greater Boston Area** and **San Francisco Bay Area** in the **US**.

Our company is dedicated to delivering **comprehensive solutions** that support our international clients in **drug discovery** and **drug development**.



What makes us unique?



Modern animal facility
located in Cracow



Contribute to the development of
a newly established In Vivo Facility
focused on oncology drug discovery



Top-notch quality
in our research



Engage in hands-on work with
advanced in vivo techniques
and methodologies



A team of dedicated
experts who believe that
science opens the door
to the future.



Shape the future of cancer
treatment by being at the
forefront of innovative in vivo
research.

Visit our website

<https://careers.selvita.com/>

Contact us:

careers@selvita.com

Selvita S.A.
Podole 79
30-394 Kraków,
Phone: + 48 12 297 47 00

Nowa seria lamp bakteriobójczych UV-C NBV
Bluetooth SWITCH obsługiwanych aplikacją NBV APP



Nowość!

- ✓ Obsługuj lampę UV-C z drugiego pomieszczenia bezpiecznie dzięki technologii Bluetooth
- ✓ Włączaj i wyłączaj za pomocą dedykowanej aplikacji
- ✓ Zaplanuj opóźnione włączenie i czas dezynfekcji



System sterowania pracą lampy bakteriobójczej UV-C NBV BT Switch pozwala na:

- ✓ ustawienie czasu pracy promienników od 1 min. do 24 h (np. 10/20/30 sekund)
- ✓ ustawienie opóźnienia włączenia urządzenia (czas na wyjście z pomieszczenia - min. 60 s - włączenia promienników UV-C)
- ✓ zliczanie czasu pracy promienników (aplikacja wyświetla informację o czasie przepracowanym i czasie pozostałym do wymiany promienników UV-C)
- ✓ sygnalizacja ostatnich 50 godzin i końca efektywnej pracy promienników UV-C (9 000 h)
- ✓ możliwość przerywania i wznowienia działania lampy w każdym momencie cyklu pracy

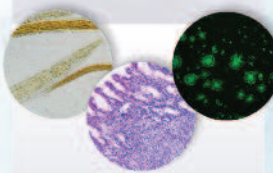


Health monitoring according to FELASA recommendations Quarterly and Annually + Large and Global programmes for mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit. We also offer customized programmes and tests.

- Serology
- Bacteriology
- Parasitology
- PCR, qPCR
- Pathology

Serological, bacteriological, parasitological, histological and molecular-diagnostic methods are used to identify the undesirable microorganisms, which can adversely affect the health of laboratory animals and research.

- Virology - serology (ELISA, IFA), PCR/qPCR
- Bacteriology - aerobic/aerobic culture, MALDI-TOF, sequencing, serology, PCR/qPCR
- Parasitology
 - Ectoparasites* - skin scraping, microscopy, PCR/qPCR,
 - Endoparasites* - flotation, native smear, PCR/qPCR,
- Pathology - dissection, gross pathology, histopathology



Our laboratory in Prague is the only independent one in the Central and Eastern Europe focused on Health Monitoring of laboratory rodents and rabbits.

- Live animals - we will arrange a comfortable „door to door“ service (up to 1000 km from Prague) by our own cars with a monitored environment during the transport.
- Samples - serum samples, dry blood spots, faeces, fur swabs, dry oral swabs, environmental swabs, Interceptor/Sentinel filters. Samples can be sent by post or courier service. We can arrange the pick up also.



Mouse Pathogens

- Viruses - Quarterly ▶ MVM, MPV, MHV, EDIM, TMEV, MNV
 - Annually - Quarterly ▶ + SEND, PVM, ECTRO, LCMV, MAD H-2, REO-3
- Bacteria - Quarterly ▶ Helicobacter spp., Rodentibacter heylfelli/pneumotropus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus faecalis/Group A, B, C, G1,
 - Annually - Quarterly ▶ + Mycoplasma pulmonis, Corynebacterium kutscheri, Clostridium piliforme, Citrobacter rodentium, Salmonella spp.
- Parasites - Quarterly and Annually ▶ Giardia muris, Spironucleus muris, Trichomonas muris, Cryptosporidium spp., Entamoeba muris, Pinworms (Aspicularis, Sphacalis), Fur mites (Mycoplasma, Myobia, Radfordia)
- Additional pathogens ▶ MCMV, K, POLY, HANT, PHV, ECUJN, LDV, LEPTO, MTV, CAR bacillus, Mycobacteria pneumoniae/ovycocci, Staphylococcus aureus, Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Mannheimia spp., Bordetella hinzii, Clostridium perfringens



Rat Pathogens

- Viruses - Quarterly ▶ KRY, RPV, RMV, H-1, PVM, RCV/SDAV, RTV
 - Annually - Quarterly ▶ + SEND, MAD H-2, REO-3
- Bacteria - Quarterly ▶ Helicobacter spp., Clostridium piliforme, Rodentibacter heylfelli/pneumotropus, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus faecalis/Group A, B, C, G1, Mycoplasma pulmonis
 - Annually - Quarterly ▶ + Streptococcus moniliformis, CAR bacillus, Salmonella spp., Pneumocystis spp.
- Parasites - Quarterly and Annually ▶ Giardia muris, Spironucleus muris, Trichomonas muris, Cryptosporidium spp., Entamoeba muris, Pinworms (Aspicularis, Sphacalis), Fur mites (Mycoplasma, Myobia, Radfordia)
- Additional pathogens ▶ ECUJN, LCMV, LEPTO, Klebsiella pneumoniae/oxytoca, Staphylococcus aureus, Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Mannheimia spp., Bordetella hinzii, Clostridium perfringens, Rodentibacter ratti

Find free by clicking on the additional information and discussion of your requirements.

AnLab
Viseňská 1063
142 20 Prague 4
Czech Republic

Tel: +420 281 711 667
E-mail: info@anlab.cz
Fax: +420 281 711 719
www.anlab.cz

IDEXX BioAnalytics
REPLACE™

**REDUCE
REFINE
REPLACE™**



**Superior sentinel-free
rodent health monitoring**

- + Eliminates the need for soiled bedding sentinels
- + Easy to use
- + Individually packaged for security
- + Works with all housing systems
- + Free from costs of equipment and supplies
- + Rigorous quality control

Learn more at idexxbioanalytics.eu/replace

Combining scanning performance with application freedom



ZEISS Axioscan 7

Digitize your specimens with Axioscan 7 – the reliable, reproducible way to create high-quality virtual microscope slides. Axioscan 7 combines qualities that you would not expect to get in a slide scanner: high speed digitization and outstanding image quality plus an unrivaled variety of imaging modes are all available in a fully automated and easy to operate system.

zeiss.com/axioscan-bio



Seeing beyond



9 788397 221307