

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Zbadanie statusu żelaza oraz molekularnych podstaw metabolizmu tego mikroelementu u prosiąt świni w miotach o regulowanej liczebności**

2. Czas trwania projektu **25 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **prosięta, żelazo, embriotransfer**

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **A**

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Projekt finansowany jest przez Narodowe Centrum Nauki w Krakowie, nr projektu badawczego: UMO-2019/33/B/NZ9/02566,

Doświadczenie dotyczy dwóch stosunkowo słabo poznanych aspektów metabolizmu żelaza u ssaków, tj. regulacji metabolizmu żelaza u nowonarodzonych prosiąt oraz transferu żelaza przez łożysko i mechanizmów go regulujących.

Celem projektu jest zbadanie statusu żelaza oraz molekularnych podstaw metabolizmu tego mikroelementu u prosiąt świni. Planuje się uzyskanie miotów świni domowej rasy Wielka Biała Polska o regulowanej liczebności prosiąt (zmniejszona liczba prosiąt w porównaniu z miotami standardowymi) na drodze przenoszenia zarodków od dawczyń, u których wywołana zostanie superowulacja, do ściśle spokrewnionych z nimi bioreczyń (siostry). Zamierza się zweryfikować, czy liczba prosiąt w miocie może mieć wpływ na status żelaza i regulację jego metabolizmu u 1-dniowych prosiąt. Kolejnym celem jest zbadanie molekularnych mechanizmów transportu żelaza przez łożysko, który jest jednym z najmniej poznanych zagadnień metabolizmu tego mikroelementu u ssaków. Sprawdzone zostanie, czy

za niski poziom zapasów żelaza w wątrobie noworodków świni są odpowiedzialne mało efektywne mechanizmy transportu żelaza z organizmu matki do organizmu płodu.

Stawiamy hipotezę, że funkcjonujące u dzika molekularne mechanizmy regulujące przepływ żelaza przez łożysko są adekwatne aby zapewnić odpowiednią ilość żelaza dla kilku noworodków, ale nie dostosowały się, w krótkim okresie gwałtownego wzrostu plenności nowoutworzonych ras świńskich, do zwiększonego zapotrzebowania na ten mikroelement. W naszych badaniach zidentyfikujemy nowe geny potencjalnie zaangażowane w transport żelaza przez łożysko i jego regulację.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W doświadczeniu wykorzystane zostanie 45 zwierząt gatunku świnia domowa (*Sus scrofa domesticus*, rasy świnia wielka biała polska (WBP) będą to lochy około 6 miesiąca życia, powyżej 90 kg masy ciała.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przy projekcie doświadczenia uwzględniono zasadę 3R. Uzasadnienie każdego z punktów podano poniżej.

Zastąpienie- Żelazo jest mikroelementem uczestniczącym w wielu procesach życiowych, wśród których erytropoeza, proces powstawania czerwonych krwinek, charakteryzuje się bardzo dużym zapotrzebowaniem na żelazo związanym z syntezą hemoglobiny. Najbardziej istotnym symptomem niedoboru żelaza w organizmie jest zaburzenie erytropoezy i niedokrwistość. Co ciekawe, patologia ta występuje powszechnie u osesków prosiąt większości współczesnych ras świni domowej. Pierwotną jej przyczyną jest krytycznie niski poziom zapasów żelaza zgromadzonych w wątrobie w okresie płodowym. Należy podkreślić, że po urodzeniu, głównym źródłem żelaza wykorzystywanego przez prosięta w procesie erytropoezy jest żelazo uwalniane z komórek wątroby i dostarczane do szpiku kostnego. W okresie noworodkowym żelazo egzogenne, absorbowane w przewodzie pokarmowym prosiąt z siary i mleka ma nieznaczny udział w zaspakajaniu potrzeb organizmu. Prosię świni domowej jest modelem zwierzęciem najlepiej odpowiadającym noworodkom ludzkim, a szczególnie wcześniakom. Przede wszystkim wcześniaków dotyczy problem anemii z niedoboru żelaza (6-14).

Co ciekawe, niedokrwistość na tle niedoboru żelaza nie występuje u prosiąt dzika, przodka świni domowej, który został udomowiony przed 10 tys. lat, ale ciągle pozostaje jednym z najbardziej popularnych gatunków ssaków dziko żyjących w Polsce. W przeciwieństwie do prosiąt świni domowej, prosięta dzika rozwijają się prawidłowo bez konieczności suplementowania preparatami żelaza (15). Od ponad 100 lat hodowcy trzody chlewnej prowadzą intensywną selekcję, która doprowadziła do powstania ras o wysokiej plenności, sięgającej ponad 10 prosiąt w miocie, co w zasadniczy sposób odróżnia je od dzika (mioty liczą na ogół 4-6 prosiąt) (16).

Celem projektu jest zbadanie statusu żelaza oraz molekularnych podstaw metabolizmu tego mikroelementu u prosiąt dzika i porównanie ich z prosiętami świni. Z kolei celem badań przedstawionych w niniejszym wniosku jest tylko sprawdzenie, czy liczba prosiąt w miocie może mieć wpływ na status żelaza i regulację jego metabolizmu u 1-dniowych prosiąt. Uzyskamy mioty świni domowej rasy Wielka Biała Polska o regulowanej liczebności prosiąt (zmniejszona liczba prosiąt w porównaniu z miotami standardowymi) na drodze przenoszenia zarodków od dawczyń, u których

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

wywołano superowulację, do ściśle spokrewnionych z nimi biorczyń. Zamierzamy sprawdzić, czy liczba prosiąt w miocie może mieć wpływ na status żelaza i regulację jego metabolizmu u 1-dniowych prosiąt. Zyskana wiedza zostanie porównana z wiedzą w zakresie molekularnych podstaw gospodarki żelazem prosiąt dzika.

Kolejnym celem jest zbadanie molekularnych mechanizmów transportu żelaza przez łożysko, który jest jednym z najmniej poznanych zagadnień metabolizmu tego mikroelementu u ssaków. Sprawdzimy, czy za niski poziom zapasów żelaza w wątrobie noworodków świni (jak również z wysokim prawdopodobieństwem noworodków ludzkich) są odpowiedzialne mało efektywne mechanizmy transportu żelaza z organizmu matki do organizmu płodu. Stawiamy hipotezę, że funkcjonujące u dzika molekularne mechanizmy regulujące przepływ żelaza przez łożysko są adekwatne aby zapewnić odpowiednią ilość żelaza dla kilku noworodków, ale nie dostosowały się, w krótkim okresie gwałtownego wzrostu plenności nowoutworzonych ras świńskich, do zwiększonego zapotrzebowania na ten mikroelement. Obrót żelaza hemowego w organizmie ssaków odbywa się szlakami niezależnymi od szlaków żelaza elementarnego. Chociaż dziki i świni są zwierzętami wszystkożernymi, w ich diecie dominują pokarmy roślinne o niskiej zawartości hemu. Ze względu na podobieństwo fizjologii świni i człowieka oraz ze względu na podobną etiologię występowania anemii z niedoboru żelaza u wcześniaków ludzkich oraz u prosiąt urodzonych w terminie, doświadczenia opisane we wniosku stanowią podstawę do opracowania skutecznych terapii zapobiegania niedoborowi żelaza u noworodków ludzkich. Kluczem jest poznanie molekularnych mechanizmów transportu żelaza przez łożysko i jego regulacji, do czego model świński jest niezwykle przydatny.

Ograniczenie - wybrano maksymalnie niską liczbę zwierząt do badań, jednak niezbędną do uzyskania takiej liczby miotów, która pozwoli na uzyskanie wiarygodnych i statystycznie istotnych wyników. Zaplanowano 15 dawczyń i 30 biorczyń ponieważ zakładamy, że skuteczność superowulacji i wypłukiwania zarodków wynosi około 60%, a skuteczność uzyskanych ciąż wynosi ok.65% (16). Z kolei skuteczność zaproszeń wynosi około 90% (ref. 1-5,16). Biorąc powyższe pod uwagę i zakładaną liczbę miotów o standardowej (6) i niskiej (6) liczebności zaplanowano wykonanie doświadczeń z użyciem ww. liczby zwierząt tj. 15 dawczyń i 30 biorczyń.

Udoskonalenie- Zasada UDOSKONALENIA polega na radykalnym minimalizowaniu bólu, cierpienia, dystresu i trwałych urazów, jakich mogą doświadczać zwierzęta, oraz na znaczącym poprawieniu ich dobrostanu. Planujemy zapobiegać stresowi przez przyuczenie zwierząt do wykonywanych procedur np. poprzez oswojenie zwierząt z personelem, zapewnienie zwierzętom właściwych warunków utrzymania i wzbogacenia środowiska (opis w punkcie 6c), co pozwala na utrzymanie zachowań typowych dla danego gatunku. Ponadto, w projekcie planowane są najnowocześniejsze technologie celem uzyskania maksymalnej liczby danych z otrzymanego materiału. W naszych badaniach zastosujemy między innymi nowoczesną technologię biologii molekularnej - NGS (Next Generation Sequencing), która pozwoli na identyfikację nowych genów potencjalnie zaangażowanych w transport żelaza przez łożysko i jego regulację. Ponadto zespół wykonujący prezentowane we wniosku procedury wykonuje je z sukcesem od ponad 20 lat co gwarantuje szybkie i sprawne ich wykonanie (ref. 6-10).

Referencje:

1. Martinez EA, Martinez CA, Cambra JM, Maside C, Lucas X, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Parrilla I, Cuello C. Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reprod Domest Anim*. 2019 Oct;54 Suppl 4:4-13. doi: 10.1111/rda.13465.
2. Martinez CA¹, Nohalez A¹, Parrilla I¹, Vazquez JL¹, Roca J¹, Cuello C¹, Rodriguez-Martinez H², Martinez EA³, Gil MA¹. Surgical embryo collection but not nonsurgical embryo transfer compromises postintervention prolificacy in sows. *Theriogenology*. 2017 Jan 1;87:316-320. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.009.
3. R.V. Knox^{S.K.}, Webel^{M.}, Swanson^{M.E.}, Johnston^{R.R.}, Kraeling^{E.} Effects of estrus synchronization using Matrix® followed by treatment with the GnRH agonist triptorelin to control ovulation in mature gilts. *Animal Reproduction Science*, Volume 185, October 2017, Pages 66-74
4. Fabio De Rensis^{Adam J.}, Ziecik^{Roy N.}, Kirkwood. Seasonal infertility in gilts and sows: Aetiology, clinical implications and treatments. *Theriogenology* 96 (2017) 111-117.
5. Haotian Wang^{Lu Chen}, Yanwen Jiang^{Shan Gao}, Shuxiong Chen^{Xue Zheng}, Zhuo Liu^{Yun Zhao}, Hongjiao Li^{Jiaxin Yu}, Fengge Wang^{Yating Liu}, Chunjin Li^{Xu Zhou} Association of gene polymorphisms of estrogen receptor, follicle-stimulating hormone β and leptin with follicular cysts in Large White sows. *Theriogenology* 103 (2017) 143-148
6. Staroń R, Van Swelm RP, Lipiński P, Gajowiak A, Lenartowicz M, Bednarz A, Gajewska M, Pieszka M, Laarakkers CM, Swinkels DW, Starzyński RR. Urinary Hecpidin Levels in Iron-Deficient and Iron-Supplemented Piglets Correlate with Hecpidin Hepatic mRNA and Serum Levels and with Body Iron Status. *PLoS One*. 2015 Aug 31;10(8):e0136695. doi: 10.1371/journal.pone.0136695. eCollection 2015.
7. Staroń R, Lipiński P, Lenartowicz M, Bednarz A, Gajowiak A, Smuda E, Krzeptowski W, Pieszka M, Korolonek T, Hamza I, Swinkels DW, Van Swelm RPL, Starzyński RR.. Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: Duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS One*. 2017 Jul 13;12(7):e0181117. doi: 10.1371/journal.pone.0181117. eCollection 2017.
8. Szudzik M, Starzyński RR, Jończy A, Mazgaj R, Lenartowicz M, Lipiński P. Iron Supplementation in Suckling Piglets: An Ostensibly Easy Therapy of Neonatal Iron Deficiency Anemia. *Pharmaceuticals* (Basel). 2018 Nov 22;11(4). pii: E128. doi: 10.3390/ph11040128. Review. Erratum in: *Pharmaceuticals* (Basel). 2019 Jan 29;12(1):.
9. Starzyński RR, Laarakkers CM, Tjalsma H, Swinkels DW, Pieszka M, Styś A, Mickiewicz M, Lipiński P.. Iron supplementation in suckling piglets: how to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *PLoS One*. 2013 May 30;8(5):e64022. doi: 10.1371/journal.pone.0064022. Print 2013.

10. Lipiński P, Styś A, Starzyński RR. Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Jan;70(1):23-38. doi: 10.1007/s00018-012-1018-1. Epub 2012 May 13
11. Svoboda M, Drabek J. Iron deficiency in suckling piglets; ethiology, clinical aspects and diagnosis. *Folia Vet.* 2005, 49, 104–111.
12. Kim JC, Wilcock P, Bedford MR. Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2018, 235, 8–14.
13. Svoboda, M.; Vanhara, J.; Berlinská, J. Parenteral iron administration in suckling piglets—A review. *Acta Vet. Brno* 2017, 86, 249–261.
14. Svoboda, M.; Pískova, K. Oral iron administration in suckling piglets—A review. *Acta Vet. Brno* 2018, 87, 77–83.
15. Kozdrowski R. Biologia rozrodu dzika. *Med. Wet.* 2004; 60:1251-1253.
16. Polish Pig Breeders and Producers Association “POLSUS”. Performance Results Pigs. 2017, pp. 17–21. Available online:
<https://polsus.pl/images/photos/Wydawnictwa/Wyniki%20Oceny/2017/WynikiOcenyTCh2017.pdf>

Przeszukano bazy z następującymi słowami kluczowymi: iron deficiency anemia; iron dextran; neonatal period; pig; supplementation; wild boars, embryo transfer

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- ☐ TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- ☐ NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.