

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Analiza transkryptomu wątroby oraz endometrium u krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w przebiegu klinicznej ketozy w okresie poporodowym.

2. Czas trwania projektu 1.07.2020-28.02.2023

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) krowa, ketoza, transkryptom, wątroba, endometrium

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.

Celem naukowym doświadczenia jest poszerzenie wiedzy dotyczącej:

-fizjologicznego transkryptomu wątroby oraz endometrium krów Holsztyńsko-Fryzyjskich i jego zmian w przebiegu klinicznej ketozy;

-wpływu ketozy na wątrobową oraz endometrialną ekspresję wybranych genów (geny kandydujące dla ketozy i wybrane enzymy);

- wpływu ketozy na poziomie mRNA na równowagę oksydacyjną organizmu i stres oksydacyjny;
- wpływu ketozy na płodność krów na poziomie mRNA endometrium;

Wyniki uzyskane w planowanym eksperymencie uzupełnią wiedzę o etiopatogenezie ketozy na poziomie mRNA hepatocytów i pozwolą na lepsze zrozumienie wpływu ketozy na ekspresję mRNA wątroby i endometrium, poziom ekspresji wybranych genów w tych narządach i zachwianie równowagi oksydacyjnej od wpływem choroby. Należy podkreślić, że tak kompleksowe badania nad wpływem ketozy na funkcjonowanie i transkryptom wątroby oraz endometrium, płodność i podatność na stres oksydacyjny na poziomie mRNA u krów nie zostały do tej pory wykonane.

Badania zostaną przeprowadzone na 24 krowach holsztyńsko-fryzyjskich w czwartym oraz siódmym tygodniu po porodzie. Na podstawie badania klinicznego, morfologicznego i biochemicznego krwi oraz nieinwazyjnego badania ultrasonograficznego wątroby krowy będą przydzielone do dwóch równych grup: 1) krowy zdrowe, 2) krowy z ketozą i wykluczonym stłuszczeniem wątroby.

Wszystkie zwierzęta zostaną poddane dwukrotnie w odstępie trzech tygodni pobraniu krwi, cienkoigłowej biopsji wątroby przy kontroli USG i biopsji endometrium macicy w celu pobrania materiału do badań hematologicznych oraz analizy transkryptomu i ekspresji genów (procedura 1 czynność 1-3).

Tkanki uzyskane w procedurze 1, czynności 2-3 zostaną poddane izolacji całkowitych matryc RNA, sekwencjonowaniu transkryptomu wątroby oraz endometrium, analizie Ampli-Seq i Real Time - PCR.

Planowane doświadczenie ma charakter badań podstawowych obejmujących wiele układów (PB11).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

24 krowy (*Bos taurus*) rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w wieku 3-5 lat

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy istniejąca wiedza w zakresie objętym wnioskiem badawczym została sprawdzona w bazach danych: EBSCO; PUBMED; ScienceDirect; Web of Science (JCR);

Wykorzystując słowa kluczowe:

Krowy, ketoza, transkryptom, wątroba, endometrium

Cow, ketosis, transcriptome, liver, endometrium

Na podstawie dostępnej literatury stwierdzam, że występuje istotna luka w wiedzy na temat globalnej ekspresji mRNA w wątrobie oraz endometrium u krów chorych na kliniczną ketozę w okresie poporodowym. Przegląd literatury wyraźnie wskazuje na potrzebę poznania molekularnych mechanizmów zachodzących podczas ketozy i jej wpływu na tkankę wątroby oraz endometrium. Skutkiem przeprowadzenia proponowanych badań będzie udostępnienie innym badaczom danych na temat transkryptomu wątroby oraz endometrium podczas klinicznej ketozy, co może wpłynąć na ograniczenie wykorzystania zwierząt podczas kolejnych badań. Projekt umożliwi także pozyskanie dodatkowej wiedzy w celu znalezienia metody leczenia ketozy uwzględniającej zmiany ekspresji genów, ograniczenie dyskomfortu, dystresu oraz poprawę płodności zwierząt.

OGRANICZENIE Czynnościami doświadczalnymi mają zostać objęte 24 krowy podzielone na 2 równe grupy (12 sztuk). Do wyznaczenia liczebności grup zostały użyte parametry biochemiczne różnicujące krowy zdrowe od chorych na ketozę oraz przewidywane różnice w ekspresji mRNA między grupami. Na podstawie przeprowadzonej analizy literatury oraz danych pochodzących z gospodarstwa (uzyskanych podczas rutynowych badań związanych z opieką weterynaryjną), w którym będzie przeprowadzane doświadczenie średnie wartości parametrów biochemicznych dla krów zdrowych mają odchylenie standardowe wynoszące 18%. Przy przyjęciu błędu pierwszego rodzaju na poziomie $\alpha = 0.05$, siły testu na poziomie $1 - \beta = 80\%$ oraz przewidywanym wzroście oznaczanych parametrów na poziomie 20 % w grupie doświadczalnej krów z ketozą, liczebność grupy powinna wynosić 12 osobników (24 łącznie). W związku z powyższym oraz zgodnie z art. 4 ust. 2 dyrektywy 2010/63/UE planowana liczba zwierząt jest minimalną liczbą pozwalającą na prawidłowe oraz rzetelne statystyczne opracowanie

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

wyników badania. Uzyskane wyniki mają posłużyć również późniejszym badaniom własnym. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych doświadczenie poszerzy wiedzę na temat transkryptomu badanych tkanek podczas klinicznej ketozy. Wyniki badań zostaną udostępnione społeczności naukowej w ogólnodostępnych bazach danych

ZASTĄPIENIE Nie można zastosować innej metody badawczej zapewniającej osiągnięcie założonych celów naukowych bez wykorzystania zwierząt. Zostały rozważone wszystkie dostępne metody zastąpienia czynności zaplanowanych w doświadczeniu. Obliczenia matematyczne oraz modelowanie komputerowe nie mogą być wykorzystane z uwagi na brak modeli komputerowych symulujących w odpowiedni sposób badane tkanki. Linie komórkowe nie mogą w obiektywny sposób oddać skomplikowanej budowy badanych tkanek. Żadna z powyższych metod nie może być więc zastosowana w celu zastąpienia zwierząt doświadczalnych oraz ograniczenia ich ilości.

DOSKONALENIE Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniu będą przebywać w pomieszczeniach stałego pobytu – znajomych, zupełnie dla nich naturalnych i nie wywołujących dystresu. Pomieszczenia oraz obsługa spełnia wymogi dla dobrostanu zwierząt gospodarskich zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. Nadzorujący doświadczenie oraz personel odpowiedzialny za zwierzęta będzie przerywał każdy zbędny ból, cierpienie, dystres oraz będzie zapewniał zgodność przestrzegania procedur doświadczenia. Zgodnie z art. 14 dyrektywy 2010/63/UE, nie zostaną zastosowane procedury mogące spowodować dotkliwy ból. Metody badawcze zostały wybrane w taki sposób, by nie powodować zbędnego bólu, cierpienia, dystresu. Badanie zostanie przeprowadzone z minimalną liczbą czynności mogących mieć negatywny wpływ na zwierzę. Żadna z procedur zastosowanych w doświadczeniu nie powoduje trwałego uszkodzenia organizmu badanych zwierząt. Osoby wykonujące są przeszkolonymi lekarzami weterynarii posiadającymi długoletnie doświadczenie w wykonywaniu czynności zaplanowanych w trakcie doświadczenia. Co należy podkreślić czynności zaplanowane w doświadczeniu są rutynowo wykonywane przez lekarzy weterynarii oraz nie stwierdzono ich negatywnego wpływu na zdrowie i płodność zwierząt.

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.