

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. 1. Tytuł projektu Rola biologicznie aktywnych substancji Paulownia CLON IN VITRO 112 w regulacji procesu metanogenezy i biouwodorowania u zwierząt przeżuwających
2. 2. Czas trwania projektu 20.05.2019-20.06.2021
3. 3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) żwacz, flawonoidy, Paulownia, metan, biouwodorowanie
4. 4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych, **F**)

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.

Ochrona środowiska naturalnego w interesie zdrowia i dobrostanu ludzi i zwierząt:

Celem naukowym projektu jest ocena możliwości wykorzystania Paulowni CLON IN VITRO 112 (Paulownia elongata x Paulownia fortunei) w żywieniu zwierząt przeżuwających w aspekcie hamowanie produkcji i emisji metanu (ograniczenie procesu metanogenezy) oraz zmian ilościowych i jakościowych zawartości kwasów tłuszczowych w płynie żwacza (proces biouwodorowania) zachodzących w ekosystemie żwacza przy jednoczesnym zwiększeniu zawartości biologicznie aktywnych, prozdrowotnych form kwasów tłuszczowych (np. C18:2 cis9, trans 11; C18:2 trans 10 cis12) w próbach mięśni.

Powodem zainteresowania stosowaniem Paulowni w żywieniu zwierząt jest jej rozwijająca się uprawa z przeznaczeniem do zastosowania w przemyśle drzewnym i duża produkcja materiału organicznego (liście o średnicy 1 metra), stanowiącego produkt uboczny „odpad”.

Hipoteza badawcza zakłada, że Paulownia CLON IN VITRO 112, jako nośnik biologicznie aktywnych substancji (m.in. flawonoidów), dodawana do dawek pokarmowych może przyczynić się do modulowania procesu fermentacji

zachodzącej w żwaczu poprzez poprawę wykorzystania składników pokarmowych dawki.

Badania *in vivo* zostaną poprzedzone testami *in vitro* z wykorzystaniem: hodowli monokultur pierwotniaczych, systemu batch culture, *In Vitro Gas Production* oraz systemu RUSITEC. Najlepsze warianty z powyższych doświadczeń zostaną przetestowane w badaniach *in vivo*, w których planuje się wykorzystać 18 owiec domowych (*Ovis aries*, jagnięta, tryczki), w tym 6 z założonymi stałymi kaniulami do żwacza, oraz 4 krowy mleczne (*Bos taurus*) również z założonymi stałymi kaniulami do żwacza.

Doświadczenie z wykorzystaniem owiec zostanie przeprowadzone w układzie blokowym -21 dni stanowić będzie okres wstępny, a kolejne 5 dni (22-26 dzień) okres właściwy, natomiast z wykorzystaniem krów mlecznych w układzie kwadratu łacińskiego 2 x 2. W układzie kwadratu łacińskiego, w każdym z dwóch okresów doświadczenia, pierwsze 21 dni stanowić będzie okres wstępny, a kolejne 5 dni (22-26 dzień) okres właściwy.

Zastosowanie układu kwadratu łacińskiego (2x2) dla krów mlecznych polegać będzie na przemiennym żywieniu [dla tej samej grupy (2 krowy mleczne) raz stosowana będzie dawka pokarmowa kontrolna (okres I), a raz dawka doświadczalna z udziałem liści z drzewa Paulowni CLON IN VITRO 112 (okres II). Zastosowanie przemiennego układu doświadczalnego spowodowało wdrożenie jedynie jednej procedury zarówno dla krów mlecznych będących w grupie kontrolnej, jak i krów mlecznych będących w grupie doświadczalnej. Zaletą wykorzystanego układu doświadczalnego jest minimalizacja liczby krów mlecznych zaplanowanych do doświadczenia. Doświadczenie na krowach mlecznych będzie prowadzone w cyklach przez 2 lata (pierwsze 1,5 roku przeznaczone będzie na wykonanie doświadczeń i wszystkich niezbędnych analiz do badań *in vitro*, a reszta okresu dedykowana jest doświadczeniu *in vivo*).

Czynnik doświadczalny w przypadku krów mlecznych może być zastosowany (w przypadku przejścia do badań *in vivo* najwyższego wariantu z badań *in vitro*) w ilości 10 kg liści z drzewa Paulowni CLON IN VITRO 112.

Projekt zakłada, że zastosowanie układu blokowego dla jagniąt polegać będzie na jednoczesnym żywieniu jagniąt przez zakładany okres doświadczenia. Doświadczenie będzie prowadzone w cyklach przez 2 miesiące (w pierwszym miesiącu zakłada się wykonanie badań *in vitro*, a w drugim miesiącu badań *in vivo*). W badaniach (grupa doświadczalna), gdzie zostaną żywione owce (jagnięta, tryczki o średniej masie 20 kg; w przypadku przejścia do badań *in vivo* najwyższego wariantu z badań *in vitro*) ilość 2 kg kisonki z liści z drzewa Paulowni CLON IN VITRO 112. Natomiast owce wykorzystane w grupie kontrolnej będą żywione standardową dawką pokarmową (2 kg kisonki z lucerny, 0,1 kg siana, 0,6 kg paszy treściwej, zwierzętom zostanie zapewniony stały dostęp do wody) i będą stanowiły punkt odniesienia do uzyskanych wyników w grupie doświadczalnej i są niezbędne do przeprowadzenia weryfikacji statystycznej.

Przewidywane szkody podczas proponowanego doświadczenia mogą wiązać się z dystresem zwierząt podczas pobierania krwi, pobierania prób płynu żwacza, chowem przemysłowym jednak wszystkie procedury zostały zaplanowane z jak najmniejszą inwazyjnością. Dodatkowo we wniosku zostały przedstawione szczegółowe opisy zasad: zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia, które z największą dokładnością eliminują prawdopodobieństwo wystąpienia szkód u zwierząt doświadczalnych. Do dodatkowych szkód, które doznają zwierzęta zaliczamy również brak pastwiska oraz śmierć. Brak pastwiska podyktowany jest analizą określonych dawek pokarmowych (zarówno w grupie doświadczalnej, jak i kontrolnej), a zastosowanie żywienia na pastwisku spowodowało by problemy nie tylko w interpretacji uzyskanych wyników, ale ich opublikowaniu (wymagane jest kontrolowane żywienie).

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Owca domowa (*Ovis aries*), jagnięta, tryczki: 18

Bydło domowe (*Bos taurus taurus*), krowa mleczna - liczba zwierząt: 4

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach danych Scopus, Web of knowledge, Pub Med., Ebsco, Google Scholar, Wiley stosując następujące słowa kluczowe: *zwacz*, *flawonoidy*, *Paulownia*, *metan*, *biouwodorowanie* i nie znaleziono opublikowanych prac z wnioskowanego zakresu badań.

Wszelkie możliwe badania o charakterze żywieniowym, w których istnieje konieczność udziału zwierząt, pozwalające ocenić wpływ zastosowanego komponentu dawki pokarmowej na procesy zachodzące w przewodzie pokarmowym, głównie w żwaczu, powinny być poprzedzone (podobnie jak w niniejszym doświadczeniu) badaniami z wykorzystaniem systemów symulujących pracę przewodu pokarmowego, głównie żołądka. Tego typu badania przeprowadzane są w warunkach *in vitro*. Proponowane układy doświadczalne (zastosowanie badań *in vitro* wyłaniających jeden najlepszy wariant z pośród 6 (badania z wykorzystaniem płynu żwacza od krów) oraz 4 (badania z wykorzystaniem płynu żwacza od owiec) pozwalają wykorzystać najmniejszą liczbę zwierząt niezbędną do uzyskania wiarygodnych wyników, pozwalających na wyeliminowanie efektu osobnika. Zastosowanie takiego układu doświadczalnego przyczyni się do uzyskania prawidłowo statystycznie zweryfikowanych wyników. Ponadto zastosowane w opisywanym doświadczeniu założenia dotyczące badań w warunkach *in vitro* są zgodne z najnowszymi i ostatnimi zaleceniami dotyczącymi badań z wykorzystaniem tego typu systemów. Badania prowadzone w warunkach *in vitro* pozwalają na weryfikowanie dużej liczby czynników doświadczalnych, z których wybrana najmniejsza liczba o najkorzystniejszym wpływie na zwierzę może być dopiero przebadana w doświadczeniu z ich udziałem.

Badania z zakresu przemian w żwaczu przeprowadzane w warunkach *in vitro* wymagają potwierdzenia w badaniach wykorzystujących zwierzęta, ale finalnie ograniczają liczbę osobników (poprzez ograniczenie liczby testowanych wariantów) niezbędnych do weryfikacji celu i hipotezy. Ponadto, badania prowadzone w warunkach *in vivo* z udziałem zwierząt biorą pod uwagę wpływ szeregu czynników, których uwzględnienie w laboratoriach jest niemożliwe. W badaniach w warunkach *in vitro* koncentracja mikroorganizmów w żwaczu jest znacznie niższa niż w doświadczeniach *in vivo*, co w przypadku przedmiotowego projektu nie pozwala na ostateczne określenie optymalnej, możliwej do zastosowania w praktyce dawki Paulowni CLON IN VITRO 112 bez badań z udziałem zwierząt.

### Spełnienie zasady 3R

**Replacement** (zastąpienie/zastępowanie) zostaną wykorzystane techniki *in vitro* (hodowla monokultur pierwotniaczych, system *In Vitro Gas Production* oraz system RUSITEC), które pozwalają na wstępne, przesiewowe badania unikające włączenia większej liczby zwierząt w planowane doświadczenia.

Powyższe techniki są ogólnie przyjętymi metodami weryfikacji czynników doświadczalnych na pierwszym etapie badań (weryfikacja dużej liczby wariantów eksperymentalnych). Zastosowanie 3 technik in vitro (standardowo stosuje się jedną technikę) pozwoli na wybranie najlepszego wariantu z punktu widzenia zdrowia i bezpieczeństwa zwierząt wykorzystanych w planowanych dalszych etapach badań. Planowane techniki są zgodne z ogólnie przyjętymi zasadami postępowania badawczego opisanego i przyjętego przez wiele laboratoriów zajmujących się badaniami z wnioskowanego zakresu i pozwala na wytypowanie w przypadku badań na krowach mlecznych i jagniętach jednego najlepszego wariantu, a następnie porównaniu z osobnikami będącymi w grupie kontrolnej.

**Reduction** (zmniejszenie/ograniczenie) W celu ograniczenia liczby zwierząt biorących udział w doświadczeniu a równocześnie zastąpienia pewnej ich liczby zostaną przeprowadzone wstępne badania in vitro (opisane powyżej), a następnie dobrano możliwie najmniejszą liczbę zwierząt, aby uzyskać reprezentatywne i wiarygodne wyniki statystycznie. Układ kwadratu łacińskiego zakłada najmniejszą liczbę zwierząt 4, podczas, gdy w układzie blokowym wykorzystano po 6 zwierząt bez przetok i po 3 z założonymi kaniulami do żwacza. Są to najmniejsze możliwe do weryfikacji i opublikowania liczby zwierząt. Liczbę zwierząt oszacowano zgodnie z dostępną literaturą światową. Należy podkreślić, że aby podejmowane działania były wiarygodne oraz eliminowały dodatkowe badania z użyciem zwierząt należy przeprowadzić je w taki sposób, aby eliminować kolejne doświadczenia z badanego zakresu. Zaproponowane układy doświadczeń, zastosowana liczba zwierząt, wykorzystane techniki in vitro, planowane spektrum interdyscyplinarnych analiz pozwala zmniejszyć liczbę doświadczeń wykorzystanych w skali międzynarodowej poprzez właściwe poznanie procesów decydujących o obserwowanych zmianach, właściwą statystyczną weryfikację uzyskanych danych. Takie działania skutkują publikacją w bardzo dobrych czasopismach naukowych nie tylko zgłębiającą wiedzę z badanego zakresu, ale wykluczającą badania z podobnego zakresu ograniczając tym samym finalnie liczbę zwierząt niezbędną do poznania działania nowych komponentów pasz.

**Refinement** (udoskonalenie) Wybrane zaproponowane procedury pozwalają na pobranie krwi i płynu żwacza, w których można oznaczyć ogromną liczbę parametrów pozwalających na kompleksową ocenę wpływu Paulowni na organizm zwierzęcia. Są to procedury o najmniejszej dotkliwości, gwarantujące jednak uzyskanie zakładanego rezultatu i poszerzenie wiedzy z zakresu oddziaływania substancji biologicznie aktywnych na procesy metanogenezy, biouwodorowania i finalnie na zdrowie i komfort zwierząt i ludzi. Pobieranie krwi jest również czynnością weterynaryjną, podczas, gdy pobieranie płynu żwacza nie dostarcza zwierzęciu żadnego bólu, pod warunkiem właściwego przeprowadzenia czynności handlingu, zastosowaniu atestowanych i bardzo nowoczesnych kaniul wykonanych z materiałów nieinwazyjnych, nie powodujących alergii i innych dyskomfortów spowodowanych ich zastosowaniem. Wiele ośrodków naukowych na świecie stosuje techniki kaniulacji, aby wpisać się wypełni w zasadę 3R oraz dla lepszego komfortu zwierząt zaangażowanych w procesy badawcze. Dla przykładu krowy mleczne będące w produkcji w Polsce w roku 2018 przebywały w stadach średnio 3,03 laktacji (około 5 lat, dane Polskiej Federacji Hodowców Bydła i Producentów Mleka) natomiast krowy z przetoką do żwacza przy właściwym handlingu, monitorowaniu zdrowotności ekosystemu żwacza, poprawiającym wymiennie komfort zwierzęcia, żyją dłużej.

Dodatkowo zastosowanie układu kwadratu łacińskiego 2x2 w wymierny sposób zmniejsza udział zwierząt w doświadczeniu zwiększając znaczenie badań w warunkach in vitro, gdzie testowanych jest bardzo wiele wariantów.

## 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

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

•

NIE