

Zarówno podkliniczne jak i ostre zapalenie wymienia powoduje ogromne straty ekonomiczne w hodowli bydła mlecznego i przemyśle mleczarskim. Jednak podłoże choroby, związane z procesami zapalnymi w zdrowych i zakażonych ćwiartkach wymion nadal nie jest w pełni znane. Wprawdzie prowadzono nieliczne badania dotyczące procesów zachodzących w zdrowych ćwiartkach wymienia sąsiadujących z zakażonymi, jednak naukowcy najczęściej wykorzystywali mleko i/lub komórki somatyczne z mleka jako materiał do analiz. Tylko nieliczne analizy prowadzone są na tkance wydzielniczej. Ponadto zazwyczaj są to próbki pozyskane po sztucznym zakażeniu ćwiartek wymienia w celu uzyskania zdrowych tkanek jako grupa kontrolna do zakażonych tego samego wymienia. **Celem pracy** jest określenie zjawisk zachodzących w mięszu gruczołu mlekowego krów mlecznych z przewagą tkanki wydzielniczej (ST) pochodzącej z ćwiartek sąsiadujących z zakażonymi gronkowcami koagulazo-dodatnimi (CoPS) lub –ujemnymi (CoNS), powodujących podkliniczne, chroniczne zapalenia (AHCops ćwiartka sąsiadująca z zakażoną CoPS; AHCNS – ćwiartka sąsiadująca z zakażoną CoNS) w porównaniu z ćwiartkami z całych zdrowych wymion (H – grupa kontrolna składająca się ze zdrowych ćwiartek). Niniejsze badanie będzie kontynuacją dotychczas prowadzonych badań.

Planowane analizy: 1. Analiza poziomu mRNA i profilu lncRNA (długie niekodujące RNA) w AHCops i AHCNS vs. CoPS, CoNS i H (NGS), 2. Analiza jakościowa i ilościowa białek w tych samych próbkach (MALDI-TOF), 3. Analiza bioinformatyczna wyników analiz transkryptomicznej, proteomicznej i epigenomicznej oraz profilu lncRNA, 4. Analiza statystyczna w celu oceny zależności między profilami mRNA, białek i lncRNA. Przeanalizowane zostaną również wyniki profilu miRNA uzyskane w ramach poprzednich projektów, 5. Analizy funkcjonalne genów o zróżnicowanej ekspresji.

Oczekiwaliśmy wyższej ekspresji genów cytokin w ćwiartkach sąsiadujących z zakażonymi niż w H. Okazało się jednak, że ekspresja genów cytokin na poziomie mRNA i białka w AHCops była na zbliżonym poziomie co w H i niższa niż w CoPS, natomiast odwrotne wyniki otrzymano dla AHCNS (ekspresja była wyższa niż w H). Było to bardzo zaskakujące, tym bardziej, że zakażenia CoNS zazwyczaj klasyfikowane są jako niepatogenne. Sugeruje się również, że krowy zakażone CoNS są mniej podatne na inne infekcje oraz, że zakażenie CoNS nie wpływa negatywnie na wydajność mleczną i jej skład. Dlatego bardzo interesujące jest poznanie dokładnych procesów zachodzących w ćwiartkach AHCops i AHCNS, gdyż rutynowo mleko z nich pobierane, jest przeznaczone do spożycia, jeżeli krowa nie jest leczona antybiotykami (szczególnie przy podklinicznym zapaleniu wymienia CoPS czy CoNS, które są często niediagnostowane).

Hipotezy: 1. Procesy zachodzące w ćwiartkach zakażonych gronkowcami wpływają na procesy fizjologiczne zachodzące w sąsiadującej, zdrowej ćwiartce poprzez wpływ na procesy transkrypcji lub translacji – stan zapalny występujący w co najmniej jednej zakażonej ćwiartce zaburza homeostazę w sąsiadującej ćwiartce prowadząc do produkcji czynników prozapalnych, które uszkadzają zdrowe tkanki pomimo braku czynników chorobotwórczych i obniżają ich produktywność; 2. Substancje stymulujące odporność mogą również przenikać przez barierę między ćwiartkami i prowadzić do wywołania odpowiedzi immunologicznej w ćwiartce niezakażonej. Oznaczałoby to, że eksperymenty, które traktują niezakażoną ćwiartkę jako kontrolną dla sąsiedniej, zakażonej ćwiartki, obciążone są znacznym błędem. Ćwiartki wymion bydła są nadal uważane za cztery osobne gruczoły.

Próbki tkanek wydzielniczych z każdej ćwiartki 50 krów mlecznych rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej zostaną pobrane po uboju, i przechowywane w temperaturze -80°C. Próbki podzielono na pięć grup: (1) CoPS (N=10), (2) AHCops (N=10), (3) CoNS (N=10), (4) AHCNS (N=10) i (5) H (N=10). Te same próbki będą wykorzystane do izolacji całkowitego RNA i białka do badań, odpowiednio transkryptomicznych i profilu lncRNA oraz proteomicznych. Analizy zaplanowane w projekcie zostaną przeprowadzone dla co najmniej 7 najlepszych próbek z każdej grupy, wybranych na podstawie jakości mRNA - o najniższym stopniu degradacji i najlepszych wskaźnikach RIN (RNA Integrity Number). Wyniki profilu miRNA z aktualnie prowadzonego projektu (PRELUDIUM BIS 2) oraz wyniki poziomu ekspresji białek, mRNA i profilu lncRNA z planowanego projektu posłużą do analiz statystycznych i funkcjonalnych w celu uzyskania bardzo kompleksowych wyników. Pozwoli to na szerokie spojrzenie na procesy zachodzące w wymionach krów, z co najmniej jedną ćwiartką zakażoną gronkowcami. Zatem pełne analizy zjawisk zachodzących w ćwiartkach zakażonych i z nimi sąsiadujących vs. H pozwolą na uzyskanie pełnej informacji o zmianach zachodzących podczas zapalenia wymienia zarówno w zakażonych, jak i zdrowych ćwiartkach. Dodatkowo, wyniki powinny jasno wyjaśniać, czy użycie zdrowych ćwiartek sąsiadujących z zakażonymi jako grupy kontrolnej dla ćwiartek zakażonych jest metodą właściwą, czy obciążoną dużym błędem. Następnie zostanie zbadane, czy mleko z ćwiartek sąsiadujących z zakażonymi, przeznaczone na rynek jest bezpieczne dla konsumentów. Zaplanowane analizy poszerzą naszą wiedzę i pozwolą zrozumieć złożone mechanizmy choroby oraz pozwolą na wyciągnięcie prawidłowych wniosków końcowych na temat procesów zachodzących w całym wymieniu, gdy zakażona jest co najmniej jedna ćwiartka. Innowacyjność projektu polega na zbadaniu wpływu zakażenia bakteryjnego jednej ćwiartki na zjawiska transkryptomiczne, proteomiczne i epigenomiczne w ćwiartkach sąsiadujących.