

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Aktywność genów białek związanych z metabolizmem żelaza po stymulacji LPS/HSA u karpia (*C. carpio*).

2. Czas trwania projektu: 1 rok i 7 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): karp, żelazo, transferyna, ferrytyna, metabolizm

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.

Głównym celem badań jest określenie dróg metabolizmu żelaza i zależności pomiędzy genami kodującymi białka, które są z nim związane a aktywnością układu immunologicznego w czasie pobudzenia aktywności mechanizmów odpornościowych dwoma różnymi immunostymulantami – LPS i HSA. Aby osiągnąć zamierzony cel zostanie przeprowadzone doświadczenie, w którym ryby zostaną podzielone na dwie grupy. Pierwszą grupę będą stanowiły ryby, którym zostanie podany LPS, czyli lipopolisacharyd, będący składnikiem błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii gramujemnych.

Rybom z drugiej grupy podana zostanie HSA, czyli ludzka albumina osocza, która również stymuluje komórki zapalne do produkcji mediatorów zapalnych. W przeciwieństwie jednak do lipopolisacharydu inicjuje proces angażujący limfocyty T. Poza grupami doświadczalnymi będziemy prowadzili również grupę kontrolną. Rybom z tej grupy zostanie zaaplikowana sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS). Następnie w wybranych punktach czasowych będziemy pobierać materiał w postaci krwi i tkanek do dalszych badań genetycznych. Spodziewane wyniki pozwolą zrozumieć zmiany zachodzące w metabolizmie żelaza takie jak np. magazynowanie żelaza w różnych tkankach (wątroba, śledziona), ograniczenie wpływu żelaza z komórek czy zahamowanie jego transportu w komórkach w warunkach fizjologicznych i w czasie aktywacji układu immunologicznego organizmu ryby. Dlatego poza mechanizmami związanymi z homeostazą tego pierwiastka zostaną bliżej poznane również procesy, w które zaangażowane jest żelazo podczas odpowiedzi immunologicznej. Zasadnym jest przeprowadzenie badań na karpie ze względu na fakt, iż jest on zaliczany do najważniejszych gatunków ryb hodowlanych, jak również jest znakomitym organizmem modelowym badań immunologicznych i genetycznych tych przedstawicieli kręgowców. Sądzymy, że podjęcie przedstawionej tematyki badawczej przyczyni się to do lepszego zrozumienia wpływu żelaza na funkcjonowanie układu odpornościowego wszystkich kręgowców, nie tylko ryb, poszerzając dotychczasową wiedzę w tej tematyce badawczej.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

260 osobników karpia (*Cyprinus carpio*)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: Reserchgate, PUBMED, Google Scholar, AGRICOLA, ScienceDirect i Web of Science(JCR).

Wykorzystałam słowa kluczowe: carp immunology, iron metabolism, iron related genes, parasite

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

infection, LPS/HSA stimulation and immunity.

Na podstawie przeanalizowanej literatury stwierdzono, że projekt badań jest innowacyjny i w pełni zasadny. Żelazo jest istotnym elementem procesów metabolicznych oraz immunologicznych. Pierwiastek ten służy jako kofaktor wielu enzymów uczestniczących w podstawowych procesach komórkowych takich jak replikacja i naprawa DNA, redukcja rybonukleotydów czy transport elektronów w mitochondriach. Zachowanie równowagi pomiędzy pobieraniem żelaza z pożywienia, a jego transportem i magazynowaniem jest niezwykle ważne i wymaga współdziałania wielu genów. U niższych kręgowców, na przykład karpia (*Cyprinus carpio* L.) rola genów związanych z metabolizmem żelaza oraz zależności pomiędzy nimi nie została jeszcze szerzej poznana. Celem podjęcia przedstawionej tematyki badawczej jest określenie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm żelaza z uwzględnieniem mechanizmów obronnych układu odpornościowego u karpia. Pozwoli to na określenie roli tego pierwiastka w funkcjonowaniu układu immunologicznego. Proponowane doświadczenie zostało zaprojektowane z myślą o efektywnej realizacji zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia (tzw. zasada 3R – replacement, reduction and refinement).

Zasada zastąpienia: Realizacja projektu badawczego związana jest z analizą poziomu ekspresji genów w organach takich jak: wątroba, śledziona, nerka głowowa, nerka tułowiowa, jelita oraz krew. Ważnym jest aby analizować organizm jako całość, uwzględniając wszelkie cechy osobnicze wpływające na całokształt homeostazy i fizjologii organizmu. Niemożliwym jest pełne zastąpienie organizmu ryby ze wszystkimi zmiennymi wpływającymi na jego status fizjologiczny. Dlatego tak ważne jest, aby organy pochodziły od osobników dorosłych z w pełni rozwiniętym układem immunologicznym.

Zasada ograniczenia: Badania zaprojektowano tak, aby do minimum ograniczyć liczbę ryb biorących udział w teście bez uszczerbku dla celów projektu. Aby uzyskane wyniki były istotne statystycznie oraz publikowalne, przeprowadzono wstępną analizę statystyczną, która pozwoliła na oszacowanie wielkości grupy doświadczalnej (metoda d Cohena). Przy dobranych parametrach analiza wykazała minimalną ilość osobników w grupie 36 (dla efektu f Cohena=0,3) i 21 (dla f =0,4) na każdy punkt czasowy. Stosując zasadę ograniczenia przyjęto 21, jako minimalną ilość osobników w grupie pozwalającą na statystycznie prawidłowe przeprowadzenie eksperymentu bez konieczności jego powtarzania. Zakładając również, że w grupie kontrolnej nie poddanej immunostymulacji nie będzie znacznych zmian w homeostazie żelaza, liczba ryb może zostać zredukowana o połowę i wynosić 10. Dalsze ograniczenie liczby ryb mogło by prowadzić do niepowodzenia doświadczenia i co za tym idzie,

naraziło by ryby na niepotrzebne i bezzasadne użycie.

Zasada udoskonalenia: Podczas prowadzenia doświadczenia ryby będą przetrzymywane w basenach, tak aby zapewnić im odpowiednie zagęszczenie, dostęp do tlenu i światła. Odławianie ryb odbywać się będzie przy pomocy kasarów, co pozwoli na wyeliminowanie uszkodzenia powłok ciała. Iniekowanie ryb HSA/LPS będzie przeprowadzone tak aby stres związany z unieruchomieniem był jak najmniejszy, a samo unieruchomienie trwało nie dłużej niż 45 sekund. Środek znieczulający (MS-222) oraz sposób jego podania (kąpiel w roztworze) ogranicza potencjalny ból i dystres. W przypadku, gdy stan ryb będzie wskazywał na znaczne cierpienie, zostaną one uśmiercone poprzez zastosowanie środka znieczulającego MS-222 w dawce letalnej (wczesne i humanitarne zakończenie procedury).

Osoby wykonujące doświadczenie posiadają wieloletnią praktykę w pracy z rybami, a czynności zaplanowane w procedurze wykonują szybko i sprawnie, przez co dystres zwierząt jest minimalny.

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.