

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Analiza porównawcza mechanizmów miogenezy podczas prawidłowego rozwoju oraz w stanach patologicznych mięśni

2. Czas trwania projektu: 01.04.2020 do 01.03.2025.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): zebrafish, danio, McArdle, Charcot – Marie – Tooth, Pygm, HSP, SHSPs, drug testing, fin-clip, genotyping, CRISPR, zebrafish husbandry, zebrafish development, muscle, myopathies

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 badań jest stworzenie nowych linii ryb danio pręgowanego (łac. Danio rerio), które staną się zwierzęcym modelem ludzkich chorób (choroby Mc'Ardlea i Charcot – Marie – Tooth). Dzięki tym modelom poznamy mechanizmy leżące u podstaw ludzkich chorób mięśniowych będziemy mogli znaleźć nowe, skuteczne leki. Do tej pory nie udało się niestety znaleźć skutecznego leku pomagającego cierpiącym na nią pacjentom. Najnowsze badania, wykonane w naszym zespole, wskazują że ryba danio może stać się bardzo dobrym modelem tej ludzkiej choroby. Posiada cechy, takie jak bardzo duże podobieństwo w budowie mięśniowego aparatu kurczliwego do ludzi, które pozwolą na stworzenie innowacyjnego, zwierzęcego modelu choroby McArdle'a i Charcot – Marie –

Tooth w przyszłości znalezienia leku ułatwiającego życie chorującym na te choroby pacjentom. Dlatego planowane jest na uzyskanych liniach zwierząt przetestowanie działania walopropionianu sodu jako substancji zmniejszającej objawy chorób.

Wyniki projektu, nowe linie ryb, będą udostępniane innym grupom badawczym na całym świecie, zgodnie z najlepszymi standardami badawczymi mającymi na celu swobodny **rozwój nauki**. Materiał i **wyniki będą służyły także w dydaktyce** prowadzonej przez Zakład, **zapewniając studentom dostęp do najnowszej wiedzy i technologii**. Materiał biologiczny będzie także udostępniany innym ośrodkom badawczym i akademickim.

Należy podkreślić, że **uzyskane nowe linie ryb**, będą udostępniane innym grupom badawczym na całym świecie, zgodnie z najlepszymi standardami badawczymi co **przyczyni się do rozwój nauki, zwłaszcza w zakresie medycyny, nowych leków i leczenia chorych pacjentów**.

Doświadczenia zostały zaplanowane w taki sposób, aby maksymalnie zniwelować stres zwierząt. Komfort osobników dorosłych zostanie zapewniony poprzez stosowanie odpowiednich środków znieczulających przed wszelkimi czynnościami powodującymi stres.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W badaniach, zaplanowanych na 5 lat, zakładane jest wykorzystanie 1000 embrionów i larw (czyli osobników na etapie do 5 dnia od zapłodnienia, nie odżywiających się jeszcze samodzielnie) oraz 252 dorosłych osobników.

Przeprowadzenie badań, mających na celu stworzenie dwóch rybich modeli ludzkich chorób (McArdlea oraz Charcot – Marie – Tooth) wymaga wykorzystania określonej liczby zwierząt, która została ograniczona do absolutnego minimum, które jest wymagane przez rzetelność naukową. Liczba wykorzystanych w badaniach zwierząt wynika z konieczności potwierdzenia istotności wyników obliczeniami statystycznymi (takimi jak testy istotności statycznej ANOVA czy test T studenta, za pomocą programów komputerowych Statistica czy Excel), które wymagają co najmniej 3 niezależnych powtórzeń eksperymentu z założeniem, że w grupie badanej jest co najmniej 9 osobników. W badaniach, zaplanowanych na 5 lat, zakładane jest wykorzystanie 1000 embrionów i larw (czyli osobników na etapie do 5 dnia od zapłodnienia, nie odżywiających się jeszcze samodzielnie) oraz 252 dorosłych osobników.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: PUBMED; Google Scholar; Scopus; Web of Science.

Wyszukiwane słowa kluczowe: zebrafish, danio, McArdle, Charcot – Marie – Tooth, Pygm, HSP, SHSPs, drug testing, fin-clip, genotyping, CRISPR, zebrafish husbandry, zebrafish development, muscle, myopathies

Na podstawie istniejącej literatury stwierdzono, że zaplanowane czynności są standardowymi metodami wykorzystywanymi w badaniach ryb. Czynności podjęte podczas prowadzenia eksperymentów zostały zaplanowane tak, aby nie powodować dodatkowego dyskomfortu ani dystresu i w jak największym stopniu ograniczyć cierpienia ryb. Wszystkie procedury wykonywane będą z należytą dokładnością i poszanowaniem dla życia i dobrostanu badanych zwierząt.

Celem doświadczenia jest stworzenie nowych linii ryb danio pręgowanego. Warto podkreślić, że badania doprowadzą do stworzenia dwóch linii ryb, będącymi modelami dwóch jednostek chorób ludzkich (McArdle oraz Charcot – Marie – Tooth). Nie można zastąpić ryb danio w planowanej analizie porównawczej mechanizmów miogenezy podczas prawidłowego rozwoju oraz w stanach patologicznych ani badaniami z zastosowaniem hodowli komórkowych, ani bezkręgowców (ze względu na brak lub niedostateczne podobieństwo aparatu mięśniowego do ludzkiego).

Przeprowadzenie badań wymaga wykorzystania określonej liczby zwierząt, która została ograniczona do absolutnego minimum, które jest wymagane przez rzetelność naukową. Liczba wykorzystanych w badaniach zwierząt wynika z konieczności potwierdzenia istotności wyników obliczeniami statystycznymi (ANOVA, test T studenta). Przy zakładanym prawdopodobieństwie błędu pierwszego rodzaju $\alpha=0.05$ i błędu drugiego rodzaju $\beta=0.08$ oraz przy założonym poziomie istotności $p\leq 0.05$ (wymagany w naukach biologicznych) oraz co najmniej 3 niezależnych powtórzeniach eksperymentu, wymagana minimalna liczebność grupy wynosi 9 osobników, dla osiągnięcia zakładanych celów. W badaniach, zaplanowanych na 5 lat, zakładane jest wykorzystanie 1000 embrionów i larw (czyli osobników na etapie do 5 dnia od zapłodnienia, nie odżywiających się jeszcze samodzielnie) oraz 252 dorosłych osobników.

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

Liczba zwierząt została zaplanowana z zastosowaniem „zasady 3R” (zastąpienie, ograniczenie, udoskonalenie).

Zastąpienie: Nie można zastąpić ryb danio w planowanej analizie porównawczej mechanizmów miogenezy podczas prawidłowego rozwoju oraz w stanach patologicznych ani badaniami z zastosowaniem hodowli komórkowych, ani bezkręgowców (ze względu na brak lub niedostateczne podobieństwo aparatu mięśniowego do ludzkiego). Wybrano gatunek, który charakteryzuje się najniższym stopniem rozwoju ewolucyjnego, a jednocześnie sprostą wymaganiom osiągnięcia celu proponowanych badań.

Ograniczenie: Przeprowadzenie badań, mających na celu stworzenie dwóch rybich modeli ludzkich chorób (McArdle’a oraz Charcot – Marie – Tooth) wymaga wykorzystania określonej liczby zwierząt, która została ograniczona do absolutnego minimum, które jest wymagane przez rzetelność naukową. W procedurze 1, mającej na celu stworzenie linii rybich modeli zostanie wykorzystane 180 ryb. Kolejnym etapem badań będzie testowanie substancji o potencjale leczniczym (procedura 2). Liczba wykorzystanych w badaniach zwierząt wynika z konieczności potwierdzenia istotności wyników obliczeniami statystycznymi (takimi jak testy istotności statystycznej ANOVA czy test T studenta, za pomocą programów komputerowych Statistica czy Excel), które wymagają co najmniej 3 niezależnych powtórzeń eksperymentu z założeniem, że w grupie badanej jest co najmniej 9 osobników. W przypadku procedury 2 wymagana liczebność próby (N) wynosi 72. Dowodem matematycznym, uzasadniającym liczbę osobników jest „analiza mocy testu” wykonana w programie Statistica, której wyniki przedstawiono poniżej:

	Liczność próby (Arkusz1)	
	Jedna średnia, test t	
	H0: $\mu_i = \mu_{i0}$	
	Wartość	
Średnia hipotezy zerowej (μ_{i0})	0,0000	
Średnia w populacji (μ_i)	1,0000	
Odch. std. w populacji (Sigma)	10,0000	
Efekt standaryzowany (Es)	0,1000	
Prawdop. bł. I rodzaju (Alfa)	0,0500	
Moc docelowa	0,9000	
Moc dla wymaganej liczebności próby N	0,9001	
Wymagana liczebność próby (N)	72,0000	

Podsumowując: w badaniach, zaplanowanych na 5 lat, zakładane jest wykorzystanie 252 dorosłych osobników ryb danio.

Udoskonalenie: Podjęte zostaną działania mające na celu udoskonalenie środowiska życia ryb i warunków utrzymania. Dla urozmaicenia i uzupełnienia diety, ryby karmione są dodatkowo żywym pokarmem (małe solowce - artemie). Takie postępowanie ma na celu m. in. wzbogacenie środowiska w dodatkowe bodźce (aktywny ruch ryb w celu złapania pokarmu) [14,15]. Urozmaicenie środowiska życia, akwarium, zostanie także zapewnione dzięki zastosowaniu elementów ekspozycji (kolorowe dno, imitacja kamieni, niewielkie przegrody). Udoskonalenie procedur zapewnia także zespół badawczy składający się z doświadczonych i doskonale wyszkolonych pracowników, którzy regularnie biorą udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach i spotkaniach dotyczących m. in. dobrostanu danio przegowanego. Wszystkie wnioskodawczynie aktywnie działają w Polskim Towarzystwie „Zebrafish”, którego statutowym zadaniem jest dbanie o dobro zwierząt i wysoką jakość badań. Wysokie standardy hodowli i badań zapewniają, że projekt zostanie zrealizowany zgodnie z zasadami 3R. Wszystkie procedury, takie jak uśmiercanie, zostały udoskonalone w taki sposób, aby nie powodować dystresu zwierząt. Oprócz planowanych doświadczeń, materiał biologiczny (tkanki, organy) zostaną wykorzystane do innych badań oraz do zajęć dydaktycznych. Materiał biologiczny będzie udostępniany innym ośrodkom badawczym i akademickim.

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.