

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Wywołanie zakaźnej martwicy trzustki u pstrąga potokowego (*Salvelinus fontinalis*) i tęczaka źródlanego (*Salvelinus fontinalis* x *Oncorhynchus mykiss*) z wykorzystaniem doświadczalnej mikroiniekcji z wirusem zakaźnej martwicy trzustki (IPNV)”
2. Czas trwania projektu: od 01. 09. 2018 r. do 30. 04. 2020 r.
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): zakaźna martwica trzustki, IPNV, pstrąg źródłany, *Salvelinus fontinalis*, mikroiniekcje, ekspresja genów
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych):

## A - badania podstawowe, układ odpornościowy:

- 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 badania jest porównanie podatności na zakażenie wirusem zakaźnej martwicy trzustki (z ang. Infectious Pancreatic Necrosis Virus – IPNV) i zbadanie po raz pierwszy ekspresji wybranych genów odpowiedzialnych za odporność przeciwwirusową oraz kodowanie cytokin prozapalnych u wczesnych stadiów rozwojowych hodowlanych ryb łososiowatych: pstrąga źródlanego *Salvelinus fontinalis* oraz jego krzyżówki międzygatunkowej z pstrągiem tęczowym *Oncorhynchus mykiss*, tzw. tęczaka źródlanego *Salvelinus fontinalis* x *Oncorhynchus mykiss*.

Zamierzamy zbadać możliwość opracowania nowych modeli infekcyjnych z wykorzystaniem IPNV oraz opisanych powyżej dwóch gatunków ryb. W badaniu do precyzyjnej symulacji zakażenia pionowego po raz pierwszy zostanie wykorzystana technika mikroiniekcji do ikry, która jest powszechnie stosowana u danio pręgowanego *Danio rerio*, a u ryb łososiowatych jest wykorzystywana w badaniach toksykologicznych. Na etapie inkubacji ikry planujemy ocenić wpływ zastosowania techniki mikroiniekcji na przeżywalność ikry i larw. W trakcie trwania eksperymentu zostanie przeprowadzona ocena wpływu zakażenia na kondycję, czas absorpcji woreczka żółtkowego i zachowanie się larw. Dzięki symulacji zakażenia pionowego, możliwym będzie określenie, jak reaguje na zakażenie organizm młodociany, z nie w pełni dojrzałym układem odpornościowym i czy zakażenie może mieć wpływ na stan narządów wewnętrznych na tak wczesnym etapie rozwoju. Ponadto informacje na temat przebiegu śmiertelności przybliżą nas do informacji, czy tęczak źródłany dziedziczy podatność na IPNV w linii matczynej (po pstrągu tęczowym) czy ojcowskiej (po pstrągu źródłanym). Projekt pozwoli odpowiedzieć na pytanie, jak zakażenie IPNV wpływa na śmiertelność ikry w trakcie inkubacji oraz śmiertelność wylęgu w ciągu trzech tygodni od wyklucia.

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

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
pstrąg źródłany <i>Salvelinus fontinalis</i>	21 dni/wylęg żerujący	614
tęczak źródłany <i>Salvelinus fontinalis</i> x <i>Oncorhynchus mykiss</i>	21 dni/wylęg żerujący	614

#### 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

**Replacement** - zasada zastąpienia będzie spełniona poprzez następujące działania:

Do badań wybrano gatunek kręgowca o możliwie najniższym poziomie rozwoju oraz zdolności odczuwania bólu i cierpienia. Ponadto badanie zostanie wykonane na najwcześniejszych stadiach rozwojowych – ikrze, larwach nieżerujących samodzielnie, a jedynie przez ostatnie 24 godziny na larwach

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

podejmujących samodzielne żerowanie. Nie ma możliwości całkowitego zastąpienia żywych zwierząt innym modelem badawczym, ponieważ badany wirus infekuje ryby łososiowate.

**Reduction** - zasada zmniejszania będzie spełniona poprzez następujące działania:

Liczba zwierząt w grupach zaplanowanych do badań została zredukowana do niezbędnego minimum umożliwiającego uzyskanie rzetelnych wyników badań. Wynika z dotychczasowego doświadczenia badaczy, zaleceń Europejskiego Stowarzyszenia Ichtiopatologów (European Association of Fish Pathologists) oraz wyliczeń statystycznych opartych na analizie wielkości próby z wykorzystaniem testu analizy jednoczynnikowej wariancji ANOVA. Dalsze ograniczenia liczebności osobników w grupie i liczby grup uniemożliwiłoby otrzymanie wiarygodnych wyników, gdyż wpływ cech osobniczych na zakażenie wirusem może być znaczący, co zostało uwzględnione w czasie projektowania doświadczenia. Ponadto uwzględniono również naturalnie występującą w warunkach hodowlanych śmiertelność obu gatunków na badanych etapach rozwoju. Dalsze ograniczanie liczby zwierząt doprowadziłoby do niepowodzenia doświadczenia, a tym samym naraziłoby zwierzęta na niepotrzebne i bezzasadne ich użycie.

Konstrukcja doświadczenia pozwala na ograniczenie do niezbędnego minimum liczby zwierząt.

Zaplanowano dwa powtórzenia każdego doświadczenia, z jednej strony pozwala to uzyskać wiarygodne wyniki a z drugiej wiąże się z ograniczeniem liczby zwierząt poddanych procedurom.

Wykonawcy posiadają duże doświadczenie w technikach i metodach doświadczalnych powoduje to, że każde z zaplanowanych w doświadczeniu zwierząt zostanie w pełni wykorzystane do uzyskania wiarygodnych wyników. Poza tym tkanki pobrane i zabezpieczone od zwierząt w doświadczeniu posłużą najprawdopodobniej w kilku kolejnych badaniach naukowych, które z tego powodu nie będą już wymagały dalszego użycia zwierząt.

Doświadczenie zaplanowano z wykorzystaniem zwierząt pochodzących z certyfikowanej hodowli.

**Refinement** - zasada udoskonalenia będzie spełniona poprzez następujące działania:

W czasie przeprowadzania eksperymentu ryby będą przetrzymywane w kontrolowanych warunkach

(punkt 5, podpunkt C), które znacznie przewyższają minimalne normy hodowlane dla tego gatunku.

Opisane w doświadczeniu czynności są standardowymi czynnościami wykonywanymi w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie. Technika mikroiniekcji jest powszechnie stosowana u danio pręgowanego *Danio rerio*, do tej pory odbyło się również kilka doświadczeń zakończonych sukcesem na rybach łososiowatych, głównie pstrągu tęczowym *Oncorhynchus mykiss* (Metcalf i Sonstegard 1984; Black i in. 1985; Metcalfe i in. 1988; Walker i in. 1992; Kotsanis i Iliopoulou-Georgudaki 1998), który stanowi gatunek modelowy dla doświadczeń z wykorzystaniem innych gatunków ryb z podrodziny *Salmoninae*. Wykonujący mają duże doświadczenie w badaniach z wykorzystaniem ryb, w tym w czynnościach opisanych we wniosku. Dzięki wieloletniej praktyce potrafią przeprowadzać opisane procedury w sposób niezwykle sprawny oraz przy minimalnym bólu oraz dystresie.

W ramach czynności doświadczalnych zaplanowana anestezja jest standardową procedurą w przypadku ryb i liczne badania naukowe potwierdzają jej skuteczność oraz brak negatywnego wpływu na zwierzę. Ponadto wybrany preparat (MS-222) jest zalecany przez American Veterinary Medical Association do wykonywania anestezji i eutanazji ryb łososiowatych.

Doświadczenie zostanie przeprowadzone w warunkach i w sposób ograniczający do minimum stres oraz cierpienie zwierząt. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostaną poddane eutanazji w sposób humanitarny i całkowicie eliminujący stres, poprzez przedawkowanie środka anestetycznego.

#### 8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

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

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.