

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Ryba w stresie – dermalny system odpowiedzi na stres – jak to działa?

2. Czas trwania projektu: 36 miesięcy

Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): ryby, skóra, stres oksydacyjny, melatonina, kortyzol

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.

Skóra kręgowców stanowi barierę biologiczną chroniącą organizm przed negatywnym wpływem czynników zewnętrznych oraz pośredniczy w wymianie informacji między środowiskiem wewnętrznym i zewnętrznym. Projekt jest kontynuacją naszych badań, w których po raz pierwszy, wykazaliśmy istnienie dermalnego systemu odpowiedzi na stres (CSRS) w skórze. Celem projektu jest znalezienie odpowiedzi na pytanie: jak działa dermalny system odpowiedzi na stres ryb kostnoszkieletowych (na przykładzie dwóch gatunków bałtyckich: ciernika i storni), gdy poddamy je działaniu stresu oksydacyjnego w warunkach laboratoryjnych? Czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny będzie dwuchromian potasu. **Nie chodzi jednak o kolejne badania dobrze poznanego stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem dwuchromianu potasu, lecz o zbadanie reakcji ze strony CSRS na stres oksydacyjny.** Najpierw przeprowadzimy badania (*in vitro*) izolowanych fragmentów skóry storni, które poddamy działaniu różnych stężeń dwuchromianu potasu i na tej podstawie wybierzemy dawki i czas

ekspozycji ryb w akwariach do właściwego eksperymentu (*in vivo*). Nie przewidujemy szkodliwego wpływu dwuchromianu potasu na badane ryby ze względu na niski zakres stężeń jak i krótki czas ekspozycji. Przypuszczamy, że melatonina, jej metabolity, kortyzol wraz z innymi wskaźnikami stresu oksydacyjnego obecnymi w skórze i śluzie ryb tworzą spójny system odpowiedzi na stres. Dowiemy się:

- czy stres oksydacyjny wpływa na biosyntezę melatoniny i powstawanie jej metabolitów w skórze ciernika i storni, a także na uwalnianie melatoniny i jej metabolitów do śluzu u storni?
- czy istnieje związek między poziomem melatoniny i jej metabolitów w skórze ciernika oraz skórze i śluzie storni a poziomem kortyzolu oraz wartościami wskaźników stresu oksydacyjnego? Chcemy przedstawić nowy mechanizm odpowiedzi na stres oksydacyjny u ryb i otworzyć nowy kierunek badań nad dermalnym systemem odpowiedzi na stres u innych kręgowców.

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

ciernik (*Gasterosteus aculeatus*) – 105 sztuk

stornia (*Platichthys flesus*) – 114 sztuk

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych:

PUBMED; ScienceDirect; Web of Science (JCR); FishBase; Research Gate; Google Scholar

Wykorzystałam słowa kluczowe:

Ryby/ skóra/ stres oksydacyjny/ dwuchromian potasu/ melatonina/ AFMK/ kortyzol/ inkubacja/ ekspresja genów/ ASMT/ AANAT

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że:

---

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

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: dwuchromian potasu jest dobrze poznanym czynnikiem oksydacyjnym przebadanym u ryb i wybranie go w naszym projekcie w celu wywołania stresu oksydacyjnego w skórze jest zasadne.

B. Brak jest danych dotyczących: dermalnego systemu odpowiedzi na stres u ryb, ponieważ zgodnie z dostępną literaturą jak dotąd nikt takich badań u ryb nie prowadził oprócz naszego zespołu. Obecny projekt jest zaawansowaną kontynuacją badań z lat 2012-2017 (projekt NCN pt. „Hormony stresu w skórze ryb”). Wtedy wykazaliśmy po raz pierwszy, że istnieją wszelkie przesłanki świadczące o tym, że w skórze ryb jest obecny lokalny system odpowiedzi na stres.

Wówczas analizowaliśmy jedynie izolowane fragmenty skóry storni, które poddawaliśmy działaniu kortyzolu, w dawkach imitujących warunki stresu, natomiast nie prowadziliśmy badań na rybach poddawanych stresowi. Dowiedliśmy, że kortyzol wpływa na uwalnianie melatoniny i jej metabolitów z fragmentów skóry storni w sposób zależny od dawki. Ponadto stwierdziliśmy, że można przyjąć z dużym prawdopodobieństwem, że melatonina i jej metabolity powstają w skórze ciernika. Choć badania dostarczyły wyraźnych przesłanek, że u ryb jest obecny dermalny system odpowiedzi na stres, pozostało znalezienie odpowiedzi na kluczowe pytanie: jak działa ten system w sytuacji, gdy ryba jest poddana działaniu stresu?

Wyniki naszych badań zostały opublikowane;

Kulczykowska E., Kleszczyńska A., Gozdowska M., Sokołowska E., 2017. The time enzyme in melatonin biosynthesis in fish: Day/night expressions of three aralkylamine N-acetyltransferase genes in three-spined stickleback. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 208, 46-53

Kulczykowska E., Kalamarz-Kubiak H., Gozdowska M., Sokołowska E., 2018. Cortisol and melatonin in the cutaneous stress response system of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 218, 1-7

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku przedstawienia nowego mechanizmu odpowiedzi na stres oksydacyjny u ryb

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na otwarciu nowego kierunku badań (nad dermalnym systemem odpowiedzi na stres) u innych kręgowców. Ponadto publikacje, które powstaną staną się podwaliną do dalszych badań nie tylko naszego zespołu, ale i wielu grup naukowców zajmujących się

stresem.

### **Zasada zastąpienia**

Zważywszy na budowę skóry ryb kostnoszkieletowych, która pokryta jest łuskami lub tarczками kostnymi i dodatkowo wydziela śluz nie można znaleźć ekwiwalentu wśród innych zwierząt dla modelu z użyciem ryb. Jednakże zastosowanie metody hodowli tkankowej *in vitro* na etapie wyboru dawek dwuchromianu potasu i czasu ekspozycji na ten czynnik, pozwala znacznie ograniczyć ilości ryb użytych do badań *in vivo*.

### **Zasada ograniczenia**

Planowane badania uwzględniają wykorzystanie najmniejszej możliwej liczby ryb w poszczególnych grupach. Przewidziana liczba ryb jest niezbędna do prawidłowego przeprowadzenia analiz zarówno biochemicznych [oznaczanie poziomu melatoniny i jej metabolitów, kortyzolu, wartości wskaźników TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), TAC (Total Antioxidant Capacity)], genetycznych [poziom ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w biosyntezie melatoniny: AANAT (N-acetylotransferaza serotoninowa) i ASMT (5-hydroksyindolo-O-metylotransferaza)], histologicznych oraz do przeprowadzenia prawidłowych analiz statystycznych otrzymanych wyników.

### **Zasada udoskonalenia**

Wszystkie procedury opisane we wniosku są zaplanowane tak, aby ograniczyć stres podczas przeprowadzania doświadczeń.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt wymiany wody z użyciem pompy akwarystycznej a nie tradycyjne przenoszenie ryb za pomocą podrywki z jednego akwarium do drugiego, co wiąże się dodatkowym stresem. Należy nadmienić, że ryby podczas aklimatyzacji są przyzwyczajane do zmiany wody w akwariach podczas rutynowych czynności związanych z ich utrzymaniem.

Poza tym zastosowanie do badań metod inżynierii tkankowej 3D *in vitro* pozwala lepiej imitować fizjologiczne warunki *in vivo*, niż w powszechnie stosowanych metodach 2D hodowli statycznej *in vitro*. Warunki hodowli 3D pozwalają na lepszy dostęp tlenu i składników odżywczych do komórek a co za tym idzie lepszą komunikację pomiędzy poszczególnymi warstwami komórek.

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.