

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: Zbadanie frekwencji limfocytów B regulatorowych produkujących IL-35 (Breg35) u myszy w ciąży prawidłowej i zagrożonej poronieniem.

1.Czas trwania projektu: 12 miesięcy

2.Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) : limfocyty B regulatorowe, interleukina 35, ciąża, mysz

3.Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): A-badania podstawowe

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 projektu jest poznanie mechanizmów, które są odpowiedzialne za indukcję tolerancji immunologicznej matki wobec antygenów ojcowskich i/lub płodowych w przed- i postimplantacyjnym okresie ciąży. Niepowodzenia ciąży, szczególnie w jej początkowym okresie są rosnącym problemem klinicznym u ludzi i zwierząt. Problem spontanicznych poronień dotyka około 1% wszystkich kobiet (Dtirrat i wsp., 1990). Przypuszcza się jednak, że częstość występowania tego problemu jest znacznie wyższa niż jest to klinicznie rozpoznawane. Około 30-40 % przypadków niepowodzeń ciąży przypada na okres przedimplantacyjny i większość przyczyn pozostaje nieznana (Jeve i Davies, 2014). Obecnie badania nad nawracającymi poronieniami są jednym z najczęściej dyskutowanych tematów. Najbardziej prawdopodobne jest, że to właśnie deregulacja natury immunologiczno-endokrynej (Saiti i wsp., 2011; Christiansen i wsp., 2013) odgrywa znaczącą rolę w utracie ciąży, dlatego podjęcie niniejszych badań jest jak najbardziej zasadne. Stąd też zainteresowanie i rozwój badań nad terapiami mogącymi odwrócić proces poronień. Celem projektowanych badań jest zbadanie częstości występowania limfocytów B regulatorowych produkujących IL-35 (Breg35) w przedimplantacyjnym okresie ciąży u myszy oraz w okresie ustabilizowanego kontaktu matka-płód w ciąży prawidłowej, jak również patologicznej. Hipoteza badawcza projektu zakłada, że komórki te uczestniczą w wytworzeniu tolerancji

immunologicznej w ciąży. Wykorzystanie żywych ssaków w tym projekcie jest nieodzowne, ponieważ nie ma do tej pory opracowanego modelu ciąży *in vitro*, a także nie ma opracowanych modeli informatycznych, które by imitowały skomplikowane mechanizmy rozwoju tolerancji immunologicznej w ciąży u ssaków. Wszystkie zaplanowane procedury cechuje łagodna dotkliwość. Użycie powszechnie używanych w badaniach reprodukcyjnych dwóch modeli doświadczalnych tj. dla ciąży prawidłowej (krzyżowanie CBA/J x Balb/c) i ciąży patologicznej- (krzyżowanie CBA/J x DBA/J - model poronny) umożliwi porównanie uzyskanych wyników z badaniami innych autorów i optymalizację protokołu doświadczalnego.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa (*Mus musculus*) CBA/J ♀ - 80 osobników

Mysz domowa (*Mus musculus*) Balb/c ♂ - 10 osobników

Mysz domowa (*Mus musculus*) DBA/2J ♂ - 10 osobników

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Zasada zastąpienia:

Przygotowując projekt badawczy została sprawdzona dotychczas istniejąca wiedza w zakresie objętym wnioskiem badawczym, w bazach danych: EBSCO, PUBMED, Google Scholar, AGRICOLA, ScienceDirect, Web of Science (JCR). Na podstawie analizy powyżej wymienionych baz danych stwierdzono, że badania będące przedmiotem wniosku nie były przeprowadzane wcześniej przez inne zespoły badawcze. Uzyskane dane pozwolą na sprawdzenie jak układ immunologiczny matki w kompartmentcie obwodowym reaguje na pojawienie się w jej organizmie antygenów ojcowskich i zarodkowych zarówno przed implantacją zarodka, jak i w późniejszych fazach ciąży. Niemożliwe jest zatem korzystanie z metod alternatywnych takich jak linie komórkowe lub bezkręgowce w celu zastąpienia modelu mysiego, ponieważ w projekcie badane są oddziaływania pomiędzy narządami układu rozrodczego i limfatycznego, których efekt możliwy jest do zaobserwowania jedynie w przypadku żywego zwierzęcia. Ponadto doświadczenie opiera się na porównaniu reakcji układu immunologicznego w stanie prawidłowej oraz patologicznej- zagrożonej poronieniem ciąży. Dobrze poznany model ww. ciąży jest krzyżówka szczepu CBA/JxDBA/2J (model ciąży poronnej) i krzyżówka szczepu CBA/JxBalb/c (model prawidłowej ciąży). Krzyżówka CBA/J x DBA/2J charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem resorpcji i śmiertelności płodów w porównaniu do modelu prawidłowej ciąży (CBA/J x Balb/c) u myszy. Jest to obecnie jedyny dobrze poznany model zwierzęcy mogący zostać użyty w badaniach nad niepowodzeniem ciąży. Proponowane badania, mają na celu rozszerzenie wiedzy na temat tolerancji immunologicznej w ciąży. Wyniki przeprowadzonych badań mogą być pomocne we wskazaniu kierunku terapeutycznej interwencji na poziomie systemowym w przypadku niepowodzeń ciąży u ludzi.

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

Zasada ograniczenia:

Liczba eksperymentów oraz zwierząt została tak zaplanowana, aby była możliwa prawidłowa analiza statystyczna. Przyjmuje się, że moc testu powinna być przynajmniej na poziomie 0,8, a częstość popełnienia błędu odrzucenia hipotezy zerowej α nie większa niż 0,05. W celu porównania powyżej wymienionych grup zostanie wykorzystany test statystyczny – jednoczynnikowa ANOVA z wykorzystaniem testów post-hoc czyli testów wielokrotnych porównań (np. test *t*-Studenta z poprawką Benferroniego). W przypadku danych, które nie będą spełniały założeń, jakie stawia się parametrycznej ANOVA, przeprowadzona zostanie analiza nieparametryczna. Wykorzystany zostanie wówczas test Kruskala-Wallisa oraz test Mana-Whitneya. W związku z tym, grupy badawcze będą liczyć 10 osobników z możliwą redukcją tej liczby w zależności od uzyskanych wyników w pierwszych prowadzonych testach. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że w naturalnym kryciu wskaźnik zapłodnienia u myszy wynosi od 50% - 100%, liczba myszy uwzględniona we wniosku jest skorelowana z tym wskaźnikiem. Dodatkowo wszystkie myszy, niezależnie od obecności/nieobecności czopu inseminacyjnego (czop inseminacyjny jest potwierdzeniem aktu krycia) muszą zostać użyte w dalszych etapach doświadczenia, ponieważ nieobecność czopa nie wyklucza ciąży/aktu krycia. Zostaną one więc uśmiercone, a ciąża lub jej brak, zostanie potwierdzona post mortem (obecność zarodków w macicy w 3 dniu, obecność płodów w 14 dniu ciąży). Myszy wykorzystywane do krycia muszą być dziewicami. Niedopuszczalne jest ponowne użycie samic, które były pokryte samcem i nie posiadały czopa inseminacyjnego, ze względu na możliwość wytworzenia się tolerancji na nasienie samca, która zaburza cele doświadczenia. Biorąc pod uwagę wysoką zmienność osobniczą w przypadku badań reprodukcyjnych (obserwacje własne) oraz powyżej wymienione, zakładana liczebność grupy statystycznej wynosi minimum $n=10$ (dotyczy to samic w ciąży). Natomiast biorąc pod uwagę wskaźnik ciąży i fakt, że myszy po kryciu nie mogą być ponownie wykorzystane w doświadczeniu, końcowa liczba myszy na grupę musi zostać zwiększona o te 50% myszy, które nie będą w ciąży, stąd też liczebność na grupę wyniesie $n=20$. W związku z powyższym faktyczna/łączna liczba samic CBA/J zaplanowana do wykorzystania we wszystkich doświadczeniach w ciąży prawidłowej (3 i 14 dzień ciąży) wynosi 40, podobnie łączna liczba samic CBA/J w ciąży poronnej (3 i 14 dzień ciąży) również wynosi 40. Od wszystkich pokrytych samic, przydzielonych do odpowiednich grup doświadczalnych pobrana zostanie krew z żyły jarzmowej, a następnie zostaną one poddane eutanazji w celu pobrania śledzion oraz węzłów chłonnych do badań.

Ponadto w 14 dniu ciąży płody zalicza się do zwierząt dlatego końcowa liczba myszy wykorzystana w doświadczeniu została powiększona o szacunkową ilość płodów (jedna samica po kryciu DBA/2J posiada średnio 6-7 płodów, natomiast po kryciu Balb/c około 9 (Ahmed A i wsp. 2010 doi:10.1371/journal.pone.0013663)).

Chcąc uwzględnić faktyczną liczbę zwierząt uśmierconych należy liczbę tę odpowiednio zwiększyć o płody:

- o z 14 dnia ciąży prawidłowej - 10 samic w ciąży x 9 płodów = 90 płodów (szacowana liczba)
- o z 14 dnia ciąży poronnej – 10 samic w ciąży x 7 płodów = 70 płodów (szacowana liczba)

W powyższych obliczeniach uwzględniano liczbę samic jako 10, a nie 20, ponieważ uwzględniono 50% sukces reprodukcyjny, który skutkuje tym, że jedynie około 10 samic na 20 biorących udział w doświadczeniu (w danej grupie) będzie w ciąży.

Samce po zakończonym okresie krycia samic zostaną poddane eutanazji w celu pobrania śledzion, z których wyizolowane zostaną splenocyty. Komórki te posłużą do zmiareczkowania przeciwciał oraz ustawienia kompensacji w jednym z doświadczeń w ramach projektu: Wieloparametryczna charakterystyka kontroli

homeostazy nabłonka układu rozrodczego przez komórki T gamma-delta z uwzględnieniem wysokorozdzielczej mikroskopii przyżyciowej (nr zgody 58/2015), w którym jestem wykonawcą.

Podsumowując ostatecznie planuje się uśmiercić:

- o 40 samic w 3 dniu ciąży (20 ciąża poronna i 20 prawidłowa)
- o 40 samic w 14 dniu ciąży (z czego tylko 20 będzie ostatecznie w ciąży poronnej i prawidłowej)
- o 160 płodów – szacowana liczba (płody samic w ciąży poronnej-70 i prawidłowej-90)
- o 10 samców DBA/2J
- o 10 samców Balb/c

Zaplanowana liczebność samców powiązana jest z koniecznością regeneracji po kryciu samicy - niemożliwe jest wykorzystanie tego samego samca kolejnego dnia. Dlatego też, biorąc pod uwagę wcześniejsze obserwacje oraz doświadczenie wnioskodawcy w podobnego typu badaniach, liczba samców została zaplanowana na 10 z każdego szczepu, co wydaje się być liczbą optymalną.

Zasada udoskonalenia:

Myszy wykorzystywane w badaniach będą przetrzymywane w odpowiednich warunkach zgodnych z wymogami, w bezstresowym środowisku, z ciągłym dostępem do pokarmu oraz wody. Ponadto wykorzystywane będą wzbogacenia środowiska w postaci ściółki oraz sterylnych drewnianych domków. Czynności w ramach procedury, którym poddane zostaną zwierzęta zostały wybrane w taki sposób, aby jak najmniej przyczyniały się do odczuwania dyskomfortu oraz stresu przez zwierzę. Zaklasyfikowane zostały one do łagodnych, jeżeli chodzi o kategorie dotkliwości. Wykonywane będą one przez odpowiednio przeszkolone osoby z wcześniejszym doświadczeniem w pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi.