

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **FAKULTET „ZARODKI I ZARODKOWE KOMÓRKI MACIERZYSTY ZWIERZĄT”**

Czas trwania projektu **01.10.2020-01.12.2023**

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **mysz, zarodek, rozwój zarodkowy, zarodkowe komórki macierzyste**

3. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **H**

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.

Fakultet „Zarodki i zarodkowe komórki macierzyste zwierząt” będzie prowadzony dla trzech 12-osobowych grup (w sumie 36 osób rocznie) studentów studiów II stopnia (magisterskich) oraz doktorantów prowadzących badania powiązane z tematyką fakultetu. Są to studenci szczególnie zainteresowani tematyką biologii rozwoju ssaków (jest to m.in. przedmiot specjalizacyjny dla studentów specjalności *Biotechnologia medyczna*). Fakultet ten jest też obowiązkowy dla studentów, którzy chcą wykonywać pracę magisterską w Zakładzie Embriologii. Fakultet „Zarodki i zarodkowe komórki macierzyste zwierząt” ma przede wszystkim cel dydaktyczny i daje studentom korzyści poznawcze. Celem zajęć jest szczegółowe zapoznanie ich z podstawowymi procesami zachodzącymi podczas oogenezy, zapłodnienia i wczesnego, przedimplantacyjnego rozwoju ssaków, takimi jak: kontrola podziałów komórkowych podczas mejozy, regulacja ekspresji genów w zarodku, przejście od matczynej do zarodkowej kontroli rozwoju, plastyczność zarodków. Rozwój zarodkowy jest skomplikowany i dynamiczny, dlatego badanie mechanizmów, które go kontrolują, jest możliwe jedynie na żywych zarodkach. Na zajęciach studenci uczą się również jak wyprowadzić zarodkowe komórki macierzyste z blastocyst myszy. Wyprowadzanie linii komórek macierzystych z wczesnych zarodków ma na celu zapoznanie studentów z procesem różnicowania

komórek zarodka myszy oraz pokazanie, że hodowane *in vitro* komórki pochodzenia zarodkowego lub płodowego mogą być wykorzystywane jako model do badania niektórych aspektów rozwoju zarodkowego. Ponadto fakultet przynosi korzyści praktyczne. Podczas zajęć studenci uczą się unikalnych i trudnych manualnie technik embriologicznych, których opanowanie jest niezbędne do prowadzenia doświadczeń na oocytach i wczesnych zarodkach myszy. Pozwala to na lepszą ocenę własnych zdolności manualnych i świadome podjęcie decyzji na temat możliwości wykonania pracy magisterskiej w Zakładzie Embriologii. Umiejętności te mogą się też przydać uczestnikom fakultetu na dalszych etapach kariery – czy to naukowej (np. doktoranci wykonujący badania wymagające zastosowania technik embriologicznych) czy zawodowej (nabyte umiejętności mogą pomóc im w znalezieniu pracy np. w klinikach leczenia niepłodności).

W trakcie doświadczeń studenci nabywają również umiejętności niezbędnych w pracy badawczej. Uczą się jak prowadzić obserwacje, analizują wyniki całej grupy, wyciągają wnioski, sporządzają protokoły, a na koniec przygotowują prezentacje opisujące i ilustrujące wykonane doświadczenia.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną oocyty, zygoty oraz wczesne, kilku-kilkunastokomórkowe przedimplantacyjne zarodki myszy hodowane *in vitro*. Studenci będą izolować zarodki z już uśmierconych samic. Wcześniejszą stymulację hormonalną na drodze zastrzyków dootrzewnowych oraz uśmiercanie metodą dyslokacji kręgów szyjnych przeprowadzą wykładowcy. Zastosowane hormony, indukujące wzrost pęcherzyków jajnikowych i owulację, są substancjami niedrażniącymi. Oba zastrzyki będą wykonywane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu, które nie jest specjalnie uwrażliwione na ból, zatem źródłem bólu będzie jedynie ukłucie igłą.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa *Mus musculus*

108 samic C57Bl6-Tg(UBC-GFP+/-)30Scha oraz 1062 samice F1(C57Bl6/Tar x CBA/Tar)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Badanie oogenezy i przedimplantacyjnego rozwoju ssaków, procesów niezwykle skomplikowanych, jest możliwe tylko z użyciem żywych zarodków uzyskiwanych z dróg rodnych samicy. Nie istnieje obecnie metoda pozwalająca na ich uzyskanie bez użycia zwierząt.

Zasada ZASTĄPIENIA: Ze względu na brak komercyjnie dostępnych programów komputerowych z dziedziny biologii rozwoju służących do celów dydaktycznych nie jest możliwe przeprowadzenie w/w zajęć przy użyciu metod alternatywnych, bez wykorzystania zwierząt. Gotowe preparaty oraz filmy, które dają wiedzę adekwatną i wystarczającą na wcześniejszym poziomie edukacji (na studiach I stopnia), pokazują jedynie przebieg rozwoju i nie dają możliwości zgłębienia mechanizmów rozwojowych, co jest wymagane na dalszych etapach kształcenia na kierunkach eksperymentalnych.

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

Możliwości zastąpienia myszy innymi zwierzętami są również bardzo ograniczone, ponieważ warsztat pracy embriologa ssaków różni się diametralnie od warsztatu badacza rozwoju innych zwierząt kręgowych czy bezkręgowych. W zagadnieniach poruszanych na fakultecie skupiamy się na rozwoju zarodkowym myszy,

ponieważ jest ona podstawowym modelem zwierzęcym w badaniach embriologicznych. Wiadomo, że biologia rozwoju myszy jest dużo bardziej zbliżona do ludzkiej niż biologia rozwoju jakichkolwiek bezkręgowców czy niższych kręgowców (Müller, W., Hassel, M., Greal, M. (2015). The Human. W: Development and Reproduction in Humans and Animal Model Species, strony: 169-213. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.).

Ponadto, procedury pracy z oocytami i zarodkami myszy są znacznie lepiej opracowane dla myszy niż dla innych gatunków ssaków. Dostępnych jest też więcej przeciwciał skierowanych przeciwko mysim białkom, co czyni pracę doświadczalną na oocytach i zarodkach myszy bardziej efektywną.

Zasada OGRANICZENIA: Zajęcia zaplanowano tak, aby przy użyciu jak najmniejszej liczby zwierząt każdy ze studentów mógł samodzielnie wykonać całe doświadczenie, a jednocześnie zestawione ze sobą wyniki całej grupy pozwalały na wyciągnięcie rzetelnych i wiarygodnych wniosków. Realizowane tematy dobrane są tak, aby stopień trudności przeprowadzanych manipulacji wzrastał stopniowo, co zapobiega stratom w materiale i sprzyja oszczędnemu wykorzystaniu zwierząt.

W celu ograniczenia liczby zwierząt poświęconych na przewidziane zajęcia zastosowana zostanie hormonalna indukcja wzrostu pęcherzyków jajnikowych oraz owulacji. Stymulacja hormonalna zapewnia zwiększoną liczbę samic pokrytych przez samce oraz samych zarodków (po stymulacji hormonalnej uzyskuje się od dwu- do trzykrotnie więcej zarodków w danym stadium niż z samic niestymulowanych). Ponadto, co niezwykle ważne, umożliwia także synchronizację owulacji u wykorzystywanych w doświadczeniu myszy oraz pozwala na dokładne ustalenie momentu sekcji myszy (tak by uzyskać zarodki w konkretnym stadium rozwoju).

Pozostałe po izolacji układu rozrodczego tkanki uśmierconych samic są dodatkowo wykorzystywane do innych zajęć dydaktycznych prowadzonych na wydziale (np. Metody badania ultrastruktury komórek) oraz np. do doświadczeń wykorzystujących izolację mięśni z kończyn.

Zasada UDOSKONALENIA:

Procedury (iniekcje dootrzewnowe hormonów) oraz uśmiercanie przez dyslokację kręgów szyjnych **nie będą wykonywane przez studentów**, ale przez osoby prowadzące zajęcia, które posiadają odpowiednie kwalifikacje i wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Metoda dyslokacji kręgów szyjnych, wykonywana przez doświadczony personel pozwala na szybkie uśmiercenie zwierzęcia z jego natychmiastową utratą świadomości. Z tego względu oraz z uwagi na potencjalny szkodliwy wpływ środków anestetycznych na rozwój zarodków izolowanych z dróg rodnych samicy odstąpiono od zastosowania uprzedniej sedacji. Zgon myszy będzie każdorazowo potwierdzany na podstawie zaniku funkcji życiowych: braku akcji serca, spontanicznego oddychania oraz reakcji na bodźce. Osoby wykonujące będą również kontrolowały dobrostan zwierząt. Zwierzęta będą miały zapewnione odpowiednie warunki bytowe. Do klatek, w których będą przebywać, będą dodawane przedmioty wzbogacające środowisko, umożliwiające budowę gniazda oraz służące do zabawy, np. tekturowe rolki.

Hormony stosowane do iniekcji są substancjami niedrażniącymi, a zastrzyki są dokonywane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu, które nie jest specjalnie uwrażliwione na ból, zatem źródłem bólu jest jedynie ułtucie igłą i procedura jest kwalifikowana jako „łagodna”. Kolejny zastrzyk stanowiłby dodatkowy stres dla zwierzęcia.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.

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

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE