

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Rola apoptozy w plastyczności przedimplantacyjnych zarodków myszy.**

2. Czas trwania projektu: 3 lata.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): apoptoza, zarodek przedimplantacyjny, mysz, plastyczność

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.

Zarodek ssaków (w tym myszy) przez stosunkowo długi okres przed implantacją zachowuje zdolności regulacyjne, przejawiające się umiejętnością adaptacji w odpowiedzi na zaburzenie jego rozwoju. W zależności od charakteru zaburzenia (nadmiar, brak lub zmiana pozycji komórek) komórki zarodka wykorzystują różne strategie regulacji aby się dostosować, zmienić swój los i kontynuować embriogenezę, która może zakończyć się urodzinami normalnego zwierzęcia. Mechanizmy leżące u podstaw zdolności regulacyjnych wczesnych zarodków myszy nie zostały dotychczas wyjaśnione. **Niniejszy projekt ma na celu zbadanie, czy apoptoza jest zaangażowana w regulację plastyczności zarodków myszy.** W doświadczeniach wykorzystane zostaną przedimplantacyjne zarodki myszy hodowane *in vitro*. Będą one izolowane z układu rozrodczego samic, które wcześniej będą stymulowane hormonalnie (dwa zastrzyki dootrzewnowe w odstępie 48 godzin) i uśmiercane metodą dyslokacji kręgow szyjnych. 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.

Wyniki proponowanego projektu pozwolą na określenie czy apoptoza jest częścią mechanizmu kontrolującego losy komórek w zarodku myszy i odpowiedzialnego za regulacyjny charakter jego rozwoju. Dzięki temu, że mechanizmy sterujące rozwojem są bardzo zbliżone u wszystkich ssaków, proponowane doświadczenia mogą

poszerzyć naszą wiedzę na temat plastyczności zarodków ludzkich.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa *Mus musculus*: 133 samice F1(C57BL6/Tar x CBA/Tar)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem w bazie PubMed (wykorzystałam słowa kluczowe: apoptosis, chimaera, embryo plasticity, regulative abilities, mouse). Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że apoptoza, czyli fizjologiczna śmierć komórki, w niezakłóconym rozwoju ssaków, w tym myszy i człowieka, występuje w oocytach oraz w ostatnim stadium rozwoju przedimplantacyjnego – blastocystie. Mimo, że stwierdzono obecność transkryptów większości genów odpowiedzialnych za apoptozę np. kaspaz czy białek z rodziny Bcl-2 w trakcie całego przedimplantacyjnego rozwoju, apoptoza nie występuje w najwcześniejszych jego etapach. Brak jest danych dotyczących występowania apoptozy w przypadku zaburzenia rozwoju na skutek np. zmiany liczby komórek w zarodku lub ich ploidii. Nasze wstępne obserwacje wskazują, że w zarodkach chimerowych tworzonych poprzez wprowadzanie zarodkowych komórek macierzystych do zarodków myszy, część blastomerów zarodka ulega eliminacji, umożliwiając zachowanie odpowiednich proporcji komórek tworzących linie komórkowe budujące blastocystę i ostatecznie prawidłowy rozwój takich chimer. Nie wiadomo jednak czy eliminacja blastomerów ma charakter apoptozy czy nekrozy. Nie wiadomo również, czy apoptoza jest indukowana wyłącznie przez komórki macierzyste, które wydzielają geny pro-apoptotyczne, czy ma charakter bardziej uniwersalny jako mechanizm zapewniający plastyczność przedimplantacyjnych zarodków myszy w przypadku zakłócenia ich rozwoju.

Zasada ZASTĄPIENIA: Badanie przedimplantacyjnego rozwoju myszy, który jest regulowany przez wiele mechanizmów, jest możliwe tylko z użyciem żywych zarodków uzyskiwanych z dróg rodnych samicy. Nie istnieje obecnie metoda pozwalająca na uzyskanie zarodków gryzoni bez użycia zwierząt. Mysz jest podstawowym modelem zwierzęcym w badaniach embriologicznych. Nie jest możliwe zastąpienie modelu mysiego zwierzętami o niższym rozwoju ewolucyjnym. Wiadomo, że biologia rozwoju myszy jest dużo bardziej zbliżona do ludzkiej niż biologia rozwoju jakichkolwiek bezkręgowców czy niższych kręgowców. Ponadto, procedury związane z zarodkami myszy oraz warunki ich hodowli *in vitro* są znacznie lepiej opracowane dla myszy niż dla innych gatunków ssaków.

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

Dostępnych jest też więcej przeciwciał skierowanych przeciwko mysim białkom, co czyni pracę doświadczalną na zarodkach myszy bardziej efektywną.

Zasada OGRANICZENIA: Doświadczenia zaplanowano tak, aby uzyskać wiarygodne, rzetelne wyniki przy użyciu jak najmniejszej liczby zwierząt. Do każdego eksperymentu przewidziano liczbę zwierząt ograniczoną do wymaganego statystycznie minimum. Liczbę tą oszacowano za pomocą kalkulatora internetowego (<http://www.biomath.info>). W celu ograniczenia liczby zwierząt poświęconych na przewidziane doświadczenia

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 od samic niestymulowanych). Ponadto, co niezwykle ważne, stymulacja hormonalna umożliwia także synchronizację owulacji u wykorzystywanych w doświadczeniu myszy oraz pozwala na uzyskanie zarodków w konkretnym stadium rozwoju. Pozostałe po izolacji układu rozrodczego tkanki uśmierconych samic oraz myszy stymulowane hormonalnie, które nie zostały zapłodnione przez samce, będą mogły być wykorzystane do innych doświadczeń (po uzyskaniu odpowiedniej zgody) oraz zajęć dydaktycznych.

Zasada UDOSKONALENIA: Procedury (iniekcje dootrzewnowe hormonów) oraz uśmiercanie przez dyslokację kręgów szyjnych będą wykonywane przez osoby posiadające 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 znieczulenia. Zgon myszy będzie każdorazowo potwierdzany na podstawie zaniku funkcji życiowych: braku akcji serca, spontanicznego oddychania oraz reakcji na bodźce. Osoby wykonujące procedury będą kontrolowały dobrostan zwierząt. Zwierzęta będą miały zapewnione odpowiednie warunki bytowe. Do klatek będą dodawane przedmioty wzbogacające środowisko, umożliwiające budowę gniazda oraz służące do zabawy, np. tekturowe rolki. W przypadku iniekcji dootrzewnowych hormonów nie będzie zastosowane znieczulenie, ponieważ dodatkowy zastrzyk zwiększyłby jedynie stres zwierzęcia.

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.
