

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: **Wpływ BPA na przebieg dojrzewania *in vitro* i homeostazę jonów Ca^{2+} w oocytach myszy**

2. Czas trwania projektu **3 lata** (15.10.2020-14.10.2023)

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **bisfenol A, oocyt, mejoza, zapłodnienie, wapń**

4. 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.

Bisfenol A (BPA) znajduje się w różnego typu produktach wykonanych z plastiku. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że ekspozycja na BPA sprzyja rozwojowi wielu chorób, w tym problemów z płodnością. W związku z tym stosowanie BPA w produktach plastikowych zostało zakazane w niektórych krajach, a w Unii Europejskiej w 2011 roku wprowadzono zakaz stosowania BPA do produkcji butelek dla niemowląt i dzieci. Nie zakazano jednak całkowicie stosowania związku w produkcji tworzyw sztucznych czy choćby opakowań do żywności. Zatem kwestia wpływu BPA na funkcjonowanie organizmu zwierząt i ludzi jest wciąż ważna i aktualna.

BPA wpływa na funkcjonowanie organizmu, ponieważ jest związkiem zakłócającym gospodarkę hormonalną. W naszych doświadczeniach chcemy zbadać niepoznany jeszcze aspekt wpływu BPA na płodność, czyli wpływ BPA na zdolność oocytów do uzyskania stadium, w którym może zająć zapłodnienie oraz do generowania poprawnej odpowiedzi na zapłodnienie (tj. oscylacji cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+}). Ponadto planujemy przybliżyć mechanizm (rolę błonowego receptora estrogenu związanego z białkami G, GPR30, oraz ścieżki sygnałowej kinazy MAP), w jaki BPA oddziałuje na oocyt. Badania przeprowadzimy na oocytach myszy, czyli modelowego gatunku w biologii rozwoju.

Korzyści dla rozwoju nauki: Brak jest danych na temat wpływu BPA na przebieg dojrzewania oocytów, w szczególności na rozwój ich zdolności do generowania oscylacji cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w odpowiedzi na zapłodnienie. Wywołane zapłodnieniem oscylacje Ca^{2+} są kluczowe dla rozwoju zarodka: pozwalają na ukończenie podziału mejotycznego i aktywację rozwoju zarodkowego. Dlatego też potwierdzenie wpływu BPA na przebieg oscylacji Ca^{2+} oraz poznanie mechanizmu tego wpływu ma ogromne znaczenie nie tylko dla biologii, ale i medycyny reprodukcyjnej.

Przewidywane szkody u wykorzystanych zwierząt: Zwierzętom będzie podawany dootrzewnowo hormon wywołujący wzrost pęcherzyków jajnikowych. Jest to jednak substancja niedrażniąca, a zastrzyk zostanie wykonany w miejscu o małej wrażliwości na ból. Oocyty wykorzystywane w doświadczeniach będą izolowane z jajników stymulowanych hormonalnie samic, uśmiercanych metodą dyslokacji kręgów szyjnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

101 samic myszy F1 (C57BL/6/Tar x CBA/Tar)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem w bazie danych PubMed (słowa kluczowe: bisphenol A, oocyte, fertilization, *in vitro* maturation, calcium, GPR30, MAPK) i nie znalazłam danych na temat podjęty w projekcie. Istniejące dane pozwalają jednak stwierdzić, że BPA obniża na jakość oocytów ssaków (doniesienia na temat podwyższania przez BPA

poziomu aneuploidii w oocytach myszy i ludzi). Nasze wstępne doświadczenia przeprowadzone na oocytach uzyskanych z niestymulowanych hormonalnie (tzn. niepoddanych procedurom doświadczalnym) myszy wskazują, że BPA wpływa także na homeostazę Ca^{2+} w oocytach, w tym na przebieg oscylacji Ca^{2+} wywołanych zapłodnieniem. Ponadto, istnieją dane wskazujące na oddziaływanie BPA z receptorem GPR30, ekspresję GPR30 w oocytach, regulację przez GPR30 ścieżki kinazy MAP i regulację przez ścieżkę kinazy MAP dojrzewania meiotycznego oocytów i generowania oscylacji Ca^{2+} . Ponieważ wpływ BPA na funkcjonowanie organizmu zwierząt i ludzi to obecnie bardzo aktualny temat badawczy, chcielibyśmy (i) zbadać wpływ BPA na przebieg dojrzewania i homeostazę Ca^{2+} w oocytach myszy; (ii) przybliżyć mechanizm oddziaływania BPA na oocyt, skupiając się na zweryfikowaniu hipotezy, że jest w to zaangażowany receptor GPR30 i ścieżka kinazy MAP.

Zasada zastąpienia

Ze względu na charakter badanych procesów (wpływ BPA na dojrzewanie meiotyczne i homeostazę Ca^{2+} w oocytach) nie jest możliwe przeprowadzenie doświadczeń bez udziału zwierząt, a z wykorzystaniem metod alternatywnych (np. linii komórkowych). Mysz jest 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. Zastąpienie myszy jednym z gatunków bezkręgowców czy niższych kręgowców, u których procesy dojrzewania meiotycznego czy zapłodnienia są regulowane inaczej niż u ssaków, nie umożliwiłoby uogólnienia uzyskanych wyników na gatunek ludzki. Ponadto, procedury pracy z oocytami są znacznie lepiej opracowane dla myszy niż dla innych gatunków ssaków. Łatwiej też uzyskane wyniki przeanalizować w kontekście istniejących już badań, czy rozwinąć w następnych projektach.

Zasada ograniczenia

W celu ograniczenia liczby wykorzystanych myszy zostanie zastosowana indukcja hormonalna wzrostu pęcherzyków jajnikowych. Pozwoli to na otrzymanie większej liczby oocytów od jednej samicy (liczba uzyskanych oocytów jest ok. 2-krotnie większa niż w przypadku samic niestymulowanych). Co więcej, stymulacja hormonalna pozwala na uzyskanie bardziej jednorodnej puli oocytów, co zmniejsza zróżnicowanie wewnątrz poszczególnych grup i pozwala zmniejszyć liczbę oocytów/zwierząt potrzebnych do przeprowadzenia analizy statystycznej. We wniosku przewidziana jest minimalna liczba zwierząt konieczna do analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Zasada udoskonalenia

Badania będą prowadzone przez osobę z wieloletnim doświadczeniem w pracy ze zwierzętami, która na bieżąco, w ścisłej współpracy z obsługą zwierzętarni, będzie kontrolować ich dobrostan. Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach będą miały zapewnione odpowiednie warunki bytowe. W klatkach będą znajdowały się wzbogacenia takie jak wełna drzewna, tekturowe rurki i domki, które posłużą do budowy gniazda i zabawy. Iniekcje dootrzewnowe hormonów oraz uśmiercanie zwierząt nie będą poprzedzone zastosowaniem znieczulenia. Dodatkowy zastrzyk przeciwbólowy spowodowałby jedynie dodatkowy stres zwierzęcia. Metoda dyslokacji kręgów szyjnych, wykonywana przez doświadczoną osobę, pozwala na szybkie uśmiercenie zwierzęcia z jego natychmiastową utratą świadomości. Zgon myszy będzie każdorazowo potwierdzany na podstawie zaniku funkcji życiowych: braku akcji serca, spontanicznego oddychania oraz reakcji na bodźce.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

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