

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Mechanizmy regulujące wielkość zarodka ssaka – chimerowe myszy jako model. I. Kiedy podczas rozwoju chimerowego zarodka myszy powstałego z połączenia dwóch zarodków dochodzi do regulacji jego wielkości?**

2. Czas trwania projektu **36 miesięcy**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **mysz, zarodek, chimera, wielkość ciała, regulacja**

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

Mimo tego, że w ostatnich dwóch dekadach badania mechanizmów regulujących wielkość ciała przyciągały uwagę wielu badaczy, nasza wiedza na temat ich podłoża molekularnego jest ciągle bardzo niekompletna. Co istotne, większość informacji zdobytych na ten temat jest konsekwencją prac prowadzonych z wykorzystaniem organizmów modelowych innych niż ssaki, przede wszystkim „muszki owocowej” *Drosophila melanogaster*. Dlatego celem tego projektu jest scharakteryzowanie nowego modelu, w którym można by badać mechanizmy regulujące wielkość zarodka ssaków. Modelem tym będą chimerowe zarodki myszy.

Zarodek chimerowy uzyskany po eksperymentalnym zlepieniu dwóch zarodków ma początkowo w przybliżeniu dwa razy więcej komórek niż normalny zarodek pojedynczy, jednak po przeszczepieniu takich zarodków do dróg rodnych samic zastępczych, nigdy nie obserwowano narodzin nienormalnie dużego potomstwa. Wykazano także, że nawet wtedy gdy zarodki chimerowe uzyska się przez zlepienie więcej niż dwóch zarodków, to jednak noworodki są normalnego rozmiaru.

W ramach doświadczeń objętych wnioskiem będziemy chcieli sprawdzić, w którym okresie rozwoju zarodkowego chimer zachodzi regulacja ich wielkości. Będzie to pierwszy etap prac wchodzących w skład szerszego projektu zmierzającego do poznania mechanizmów molekularnych regulujących wielkość zarodka u ssaków.

W doświadczeniach wykorzystamy zarodki przedimplantacyjne izolowane z pokrytych samic myszy. Chimerowe zarodki eksperymentalne będą uzyskiwane przez agregację dwóch zarodków 8-komórkowych i ich hodowlę in vitro przez 24 godz. Chimerowe blastocysty eksperymentalne i kontrolne zarodki pojedyncze będą transplantowane do macic samic bioreczerw w ciąży rzekomej – krytych wazektomowanymi samcami.

Aby dokładnie określić czas zachodzenia regulacji samice bioreczerw będą zabijane i poimplantacyjne zarodki chimerowe oraz pojedyncze niechimerowe zarodki kontrolne będą izolowane w 5,5, 6,5 i 7,5 dniach rozwoju. W zarodkach tych zostanie ustalona liczba komórek i porównana pomiędzy grupami doświadczalną i kontrolną.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Gatunek/stado/szczep	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
mysz F1(C57BL6/ Tar x CBA/Tar) (samice)	6-10 tygodni	317
mysz F1(C57BL6/ Tar x CBA/Tar) (samce)	2-3 miesiące	10

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

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

__EBSCO; X PUBMED; __Google Scholar; __AGRICOLA; __ScienceDirect; __Web of Science (JCR);
__.....

Wykorzystałam/em słowa kluczowe:

embryo/chimaera/development/size regulation/body size

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

Na podstawie przeszkucia istniejącej literatury, stwierdzam że: informacje dotyczące mechanizmów regulujących wielkość zarodka ssaka są bardzo fragmentaryczne. Badania nad mechanizmami molekularnymi tych mechanizmów prowadzone były prawie wyłącznie na bezkręgowcach, głównie *Drosophila melanogaster*.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że: badania dotyczące regulacji wielkości chimerowych zarodków myszy przeprowadzone były dawno temu, stosowane wtedy techniki nie pozwalały na bezpośrednie określenie liczby komórek zarodka poimplantacyjnego w danym momencie rozwoju i uzyskane wyniki są zatem bardzo przybliżone. Różne źródła podają sprzeczne informacje nt. tego kiedy w rozwoju chimer dochodzi do regulacji ich wielkości.

B. Brak jest danych dotyczących: dokładnego momentu, kiedy w rozwoju chimer dochodzi do regulacji wielkości.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: określenie tego, kiedy w rozwoju zarodków chimerowych dochodzi do regulacji ich wielkości.

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku zastosowania chimer myszy jako modelu badań, w których dążyć się będzie do poznania mechanizmów komórkowych i molekularnych, które regulują rozwój zarodka ssaka.

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na lepszym zrozumieniu bardzo słabo dotąd poznanych mechanizmów kontrolujących wzrost ciała płodu w czasie rozwoju organizmu modelowego ssaka – myszy. Znaczenie tej wiedzy będzie nie tylko czysto poznawcze, gdyż bierze się także z tego że zaburzenia procesów kontrolujących wzrost organizmu mogą być przyczyną wad rozwojowych, a także nowotworów. Zatem poznanie podłoża tych procesów może być istotne dla opracowania stosownych terapii oraz procedur diagnostycznych i zapobiegawczych.

Zasada ZASTAPIENIA: Badanie przedimplantacyjnego rozwoju, który jest regulowany przez wiele mechanizmów, jest możliwe tylko z użyciem żywych zarodków uzyskiwanych z dróg rodnych samicy. Nie istnieje obecnie metoda pozwalająca na ich uzyskanie bez użycia zwierząt. Uśmiercanie samicy myszy jest mniej dotkliwe niż uzyskiwanie układu rozrodczego drogą operacyjną, co wiązałoby się z koniecznością usypiania, uśmiercania bólu pooperacyjnego oraz utrzymywania przy życiu okaleczonego zwierzęcia. Usunięcie układu rozrodczego wiąże się z brakiem estrogenów, co powoduje m.in. znaczne zaburzenia dotyczące gospodarki lipidowej i wapniowej, przyczyniając się do zmniejszenia komfortu życia zwierzęcia.

Zasada OGRANICZENIA: Doświadczenia zaplanowano tak, aby uzyskać rzetelne wyniki przy użyciu jak najmniejszej liczby zwierząt. 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 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.

Zasada UDOSKONALENIA: Procedury (iniekcje dootrzewnowe hormonów, transplantacja zarodków oraz wazektomia) oraz uśmiercanie przez dyslokację kręgów szyjnych będą wykonywane przez osoby posiadające odpowiednie kwalifikacje i wieloletnie doświadczenie w pracy ze zwierzętami. Osoby te będą również 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. Iniekcje dootrzewnowe hormonów i uśmiercenie są kwalifikowane jako łagodne lub umiarkowane pod względem stopnia dotkliwości, dlatego nie ma powodu do stosowania znieczulenia przy ich wykonywaniu. Dodatkowy zastrzyk zwiększyłby jedynie stres zwierzęcia. Wazektomia przeprowadzona będzie najmniej inwazyjną metodą, czyli przez mosznę. W przypadku zwierząt przeznaczonych na transplantację lub wazektomię, zastosowanie środka usypiającego i przeciwbólowego/przeciwzapalnego oraz znieczulającego w miejscu pola operacyjnego zapewni przeprowadzenie zabiegu jak najmniej boleśnie, minimalizując stres, któremu będą poddawane.

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.