

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „**Rola wybranych mikrona w różnicowaniu pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnym zarodku myszy**”

2. Czas trwania projektu ..... **15.01.2019-15.01.2022**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) ... **embryonic stem cells, microRNA, gene expression, mouse embryo**

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 ssaka (w tym myszy) w swoim rozwoju przedimplantacyjnym wykształca dwie pozazarodkowe linie komórkowe - trofektodermę i pierwotną endodermę. Są one bardzo istotne dla przyszłego rozwoju zarodka, ponieważ trofektoderma umożliwia implantację w macicy i buduje trzon łożyska, natomiast pierwotna endoderma stanowi część błony płodowej, która nazywa się pęcherzykiem żółtkowym. Mechanizmy, które regulują powstawanie trofektodermy i pierwotnej endodermy nie są do końca poznane. Badania zawarte w projekcie mają odpowiedzieć na pytanie czy w proces różnicowania linii TE i PE zaangażowane są wybrane cząsteczki mikroRNA, znane ze swojej funkcji regulacji ekspresji genów w różnych procesach, m.in. w różnicowaniu komórek.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną przedimplantacyjne zarodki myszy od stadium zygoty do stadium blastocysty, hodowane *in vitro*. Będą one izolowane z układu rozrodczego samic, stymulowanych hormonalnie, łączonych z samcami a następnie uśmiercanych. 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. Zapłodnione myszy będą uśmiercane metodą dyslokacji kręgów szyjnych. Jest to metoda pozwalająca na szybkie uśmiercenie zwierzęcia z jego natychmiastową utratą świadomości. Następnie z myszy będą wycinane jajowody i macice, w celu wyizolowania zarodków. Od tego momentu zarodki będą hodowane in vitro, w odpowiednich układach eksperymentalnych, których wyniki pozwolą na wyciągnięcie wniosków dotyczących udziału cząsteczek mikroRNA w różnicowaniu trofektoderm i pierwotnej endodermi. Zastosowane zostaną metody molekularne określające ekspresję genów oraz mikroskopia konfokalna, dzięki której będzie można zobrazować tworzące się komórki każdej badanej linii komórkowej.

Wyniki proponowanego projektu pozwolą na lepsze poznanie procesu tworzenia pozazarodkowych linii komórkowych podczas rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy. Mechanizmy te mogą być bardzo zbliżone u wszystkich ssaków, również u człowieka. Z tego względu wykazanie udziału cząsteczek mikroRNA w tych procesach może mieć duże znaczenie, ponieważ ich ekspresja może być markerem określającym potencjał rozwojowy zarodków.

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

348 samic myszy F1 (C57BL6/Tar x CBA/Tar)

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem w bazie PubMed. Na tej podstawie mogę powiedzieć, że cząsteczki mikroRNA funkcjonują jako regulatory ekspresji około 60% genów ssaków, związanych z wieloma procesami, m.in. różnicowaniem komórek. Jednakże brak jest szczegółowych danych dotyczących udziału mikroRNA w różnicowaniu trofektoderm i pierwotnej endodermi w przedimplantacyjnym zarodku myszy. Wykryto ekspresję 67 różnych cząsteczek mikroRNA występujących na różnych stadiach rozwoju, poczynawszy od zygoty aż do stadium blastocysty. Spośród nich na uwagę zasługują mikroRNA-93 i mikroRNA-125a.

MikroRNA-93, w przeciwieństwie do innych przedstawicieli tej rodziny, takich jak miR-17-5p, miR-20a, miR-93 i miR-106a, lokalizuje się specyficznie w komórkach PE i TE, co może wskazywać na jego rolę w różnicowaniu tych linii komórkowych.

Z kolei mikroRNA-125a jest jedną spośród 8 cząsteczek mikroRNA, których ekspresja wzrasta zarówno w komórkach ES różnicujących w linię trofektodermalną (komórki TS) jak również w zarodkach przedimplantacyjnych

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

od stadium 8-komórkowego do stadium blastocysty. Wobec tego mikroRNA-125a będzie badane jako cząsteczka, która może brać udział głównie w różnicowaniu komórek TE. Nie jest jednak wykluczony jej udział w różnicowaniu linii PE.

**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 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. 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 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 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 są kwalifikowane jako łagodne pod względem stopnia dotkliwości, dlatego nie ma powodu do stosowania znieczulenia przy ich wykonywaniu. Dodatkowy zastrzyk zwiększyłby jedynie stres zwierzęcia.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

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

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

X NIE

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.