

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Rola akwaporyn w procesie kawitacji zarodków myszy**

2. Czas trwania projektu **4 lata (15.12.2020 – 14.12.2024)**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **mysz, blastocysta, kawitacja, akwaporyna, jama blastocysty**

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.

Blastocysta jest tym stadium rozwojowym, w którym zarodek implantuje się w macicy matki by kontynuować swój rozwój, dlatego bardzo ważne jest poznanie mechanizmów, które odpowiadają za jej prawidłowe utworzenie. Kluczowym procesem prowadzącym do powstania blastocysty jest kawitacja, czyli utworzenie wypełnionej płynem jamy wewnątrz zarodka. Pojawienie się jamy blastocysty, jej wzrost i utrzymanie jest możliwe dzięki kilku współdziałającym mechanizmom. Jednym z nich jest napływ wody do wnętrza zarodka, co najpewniej odbywa się poprzez białka z rodziny akwaporyn. Celem naszego projektu jest określenie, czy i które akwaporyny pełnią rolę na poszczególnych etapach procesu kawitacji.

Korzyści dla rozwoju nauki: dane literaturowe dotyczące ekspresji i roli akwaporyn w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków myszy są czasem sprzeczne i dość wyrywkowe. W stadium blastocysty eksprymowane są cztery akwaporyny: 3, 7, 8 i 9, ale ich rola na poszczególnych etapach procesu kawitacji nie została do tej pory poznana. Ponadto, brakuje badań wiążących aktywność akwaporyn z dynamiką procesu tworzenia się jamy, co będzie jednym z celów naszych doświadczeń. Badania przeprowadzimy

na zarodkach myszy, która jest modelowym organizmem w biologii rozwoju, dzięki czemu nasze badania nie tylko poszerzą naszą wiedzę na temat mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie blastocysty, ale mogą mieć też znaczenie praktyczne poprzez optymalizację warunków hodowli zarodków czy protokołów zapłodnienia in vitro.

Przewidywane szkody u wykorzystanych zwierząt: W doświadczeniach wykorzystane zostaną przedimplantacyjne zarodki myszy hodowane in vitro. Aby je uzyskać, samicom myszy będą podawane dootrzewnowo, w odstępie 48 godzin, dwa hormony wywołujące dojrzewanie oocytów i owulację. Są to substancje niedrażniące, a zastrzyki będą wykonywane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu o małej wrażliwości na ból. Zarodki do doświadczeń będą izolowane z układu rozrodczego samic uśmiercanych metodą dyslokacji kręgów szyjnych.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

258 samic myszy F1 (C57Bl/Tar x CBA/Tar)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziliśmy istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem w bazie danych PubMed. Wykorzystaliśmy słowa kluczowe: mouse, blastocyst, cavitation, aquaporin, pulsations. Dotychczas uzyskane dane dotyczące interesujących nas zagadnień są wybiórcze i często sprzeczne. Na obecną chwilę ustalono, że w stadium blastocysty ekspresji ulegają cztery akwaporyny: 3, 7, 8 i 9. Nie zbadano jednak w sposób dogłębny ich roli zarówno w tworzeniu jamy, jak i wpływu na dynamikę kawitacji na jej późniejszych etapach, co skłoniło nas do skupienia się na określeniu znaczenia tych białek w sposób dokładny i kompleksowy. Badanie mechanizmów powstawania jamy jest szczególnie ważnym zagadnieniem, ponieważ kawitacja jest kluczowym etapem w rozwoju zarodka warunkującym jego prawidłową implantację.

Zasada zastąpienia

Ze względu na charakter badanych procesów (mechanizmy warunkujące prawidłową morfogenezę blastocysty) 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 (Müller et al., 2015; The Human, w: Development and Reproduction in Humans and Animal Model Species, s. 169-213. Springer-Verlag Berlin Heidelberg). Zastąpienie myszy zwierzętami o niższym rozwoju ewolucyjnym, np. bezkręgowcami, u których procesy embriogenezy przebiegają w zupełnie inny sposób, uniemożliwiłoby więc przełożenie uzyskanych wyników na gatunek ludzki. Ponadto, procedury pracy z zarodkami są

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

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 oraz owulacji. Pozwoli to na otrzymanie większej liczby zarodków od jednej, pokrytej przez samca samicy (liczba uzyskanych zarodków jest ok. 2-3-krotnie większa niż w przypadku samic niestymulowanych). Ponadto stymulacja hormonalna pozwala na synchronizację owulacji u wykorzystywanych w doświadczeniu myszy, dzięki czemu uzyskuje się zarodki na pożądanym etapie rozwoju. We wniosku przewidziana jest minimalna liczba zwierząt konieczna do analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Zasada udoskonalenia

Procedury będą wykonywane przez wykwalifikowane osoby z wieloletnim doświadczeniem w pracy ze zwierzętami. Dobrostan zwierząt będzie na bieżąco kontrolowany we współpracy z obsługą zwierzętarni i weterynarzem. Zwierzęta wykorzystywane w doświadczeniach będą miały zapewnione odpowiednie warunki bytowe. W klatkach będą znajdowały się wzbogacenia, takie jak wełna drzewna, tekturowe rurki i/lub domki, które posłużą do budowy gniazda i zabawy. Zastosowane w procedurach hormony są substancjami niedrażniącymi, a zastrzyki dootrzewnowe będą podawane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu, które nie jest specjalnie uwrażliwione na ból. Dlatego odstąpiono od zastosowania znieczulenia, gdyż zastrzyk przeciwbólowy spowodowałby jedynie dodatkowy stres zwierzęcia. Metoda dyslokacji kręgów szyjnych, wykonywana przez doświadczony personel, 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.