

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Rola długiej fazy M pierwszego podziału zarodkowego myszy w poprawnej segregacji chromosomów zarodka**
2. Czas trwania projektu **2 lata (1.03.2019-28.02.2021)**
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **zygota, podział komórkowy, punkt kontrolny na wrzecionie, mysz, Plk1**
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.

Czas między rozpadem otoczki jądrowej a początkiem anafazy jest kluczowy dla utrzymania stabilności genomowej komórki. To wtedy tworzy się wrzeciono podziałowe oraz połączenia pomiędzy chromosomami a mikrotubulami wrzeciona, procesy kluczowe dla prawidłowego rozdzielenia chromatyd siostrzanych do komórek potomnych.

Pierwszy podział mitotyczny zarodka jest unikalny, ponieważ u wielu gatunków zwierząt, w tym myszy i prawdopodobnie człowieka, trwa dłużej niż kolejne podziały. W zarodkach myszy pierwsza mitoza trwa 90-120 min, podczas gdy druga tylko 60-80 min. Dla porównania, w komórkach somatycznych długość fazy M waha się od 30 do 60 minut, w zależności od rodzaju komórki i długości regulowanej przez punkt kontrolny na wrzecionie prometafazy, tj. okresu, w którym tworzy się wrzeciono i prawidłowe przyłączenia chromosom-mikrotubula.

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że zahamowanie punktu kontrolnego na wrzecionie za pomocą inhibitora rewersyny lub nadekspresji kinazy Plk1 mogą skrócić czas trwania zygotycznej fazy M do długości obserwowanych w czasie drugiego podziału zarodkowego. Niedawno pokazano także, że proces tworzenia się wrzeciona mitotycznego w zygotach przebiega w bardzo specyficzny sposób: początkowo tworzą się dwa osobne wrzeciona dla żeńskich i męskich chromosomów, wyróżnicowujących z żeńskiego i męskiego przedjądrza, które następnie scalają się w jedno wrzeciono. **W niniejszym projekcie chcemy sprawdzić, czy dłuższy czas trwania fazy M w zygotach jest związany z zapewnieniem im wystarczającej ilości czasu do wytworzenia prawidłowego wrzeciona i w następstwie poprawnego rozdzielenia chromatyd.**

Korzyści dla nauki. Prawidłowy rozdział chromatyd w czasie podziałów zarodkowych jest kluczowy dla poprawnego rozwoju zarodka. Poznanie mechanizmów go warunkujących może nam pomóc zrozumieć przyczyny powstawania aberracji chromosomowych w zarodkach ssaków, w tym ludzi.

Przewidywane szkody u wykorzystanych zwierząt: Zwierzętom będą podawane dootrzewnowo hormony wywołujące dojrzewanie oocytów i owulację. Są to jednak substancje niedrażniące, a zastrzyk zostanie wykonany w miejscu o małej wrażliwości na ból.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

77 samic myszy (*Mus musculus*): 60 samic F1 (C57BL/6/Tar x CBA/Tar) i 17 samic Tar:SwissH2BGFP

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem w bazie danych PubMed (słowa kluczowe: zygoty, embrio, M-phase, SAC, spindle) i nie znalazłam danych pozwalających odpowiedzieć na stawiane przeze mnie pytanie. Jednocześnie, istniejące dane literaturowe jednoznacznie wskazują na różnice w sposobie regulacji czasu trwania fazy M oraz tworzenia się wrzeciona podziałowego w pierwszym i kolejnych podziałach zarodka. W czasie pierwszej zarodkowej fazy M w odmienny sposób (w porównaniu do kolejnych cykli zarodkowych i cykli mitotycznych w typowych komórkach somatycznych) regulowana jest degradacja ważnych dla cyklu komórkowego białek: cykliny B1 i A2. Wydaje się też, że w pierwszym podziale zarodkowym, oprócz punktu kontrolnego na wrzecionie istnieje dodatkowy mechanizm wpływający na czas trwania fazy M. Niedawno pokazano także, że proces tworzenia się wrzeciona mitotycznego w zygotach przebiega w bardzo specyficzny sposób: początkowo tworzą się dwa osobne wrzeciona dla żeńskich i męskich chromosomów, wyróżnicowujących z żeńskiego i męskiego przedjądrza, które następnie scalają się w jedno wrzeciono. Dane te uzasadniają cel proponowanego badania. Warto też podkreślić, że prawidłowy rozdział chromatyd w czasie podziałów zarodkowych jest kluczowy dla poprawnego rozwoju zarodka. Poznanie mechanizmów go warunkujących może nam pomóc zrozumieć przyczyny powstawania aberracji chromosomowych w zarodkach ssaków, w tym ludzi

Zasada zastąpienia

Ze względu na charakter badanych procesów (mechanizmy warunkujące prawidłowy rozwój zarodka) nie jest możliwe przeprowadzenie doświadczeń bez udziału zwierząt, a z wykorzystaniem metod alternatywnych. 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 zapłodnienia i rozwoju przebiegają inaczej niż u ssaków, nie umożliwiłoby uogólnienia uzyskanych wyników na gatunek ludzki. Ponadto, procedury pracy z zarodkami 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 oraz owulacji. Pozwoli to na otrzymanie większej liczby oocytów/zarodków od jednej samicy (liczba uzyskanych oocytów/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

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. Z racji tego, że opisane we wniosku iniekcje dootrzewnowe hormonów oraz uśmiercanie zwierząt są kwalifikowane jako łagodne lub umiarkowane pod względem stopnia dotkliwości, nie będzie stosowane znieczulenie przy ich wykonywaniu. Dodatkowy zastrzyk przeciwbólowy spowodowałby jedynie dodatkowy stres zwierzęcia.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną

- TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy
- TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy
- X NIE