

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu : **“Wpływ hodowli *in vitro* oraz reorganizacji wewnętrznej struktury zarodka myszy na rozwój i zachowanie potomstwa.”**

2. Czas trwania projektu: 19 miesięcy

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): procedury wspomaganego rozrodu, ART, biopsja, dezagregacja, *in vitro*.

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.

W procedurach wspomaganego rozrodu (ART) człowieka często stosowanym zabiegiem jest biopsja blastomeru (BB), która pozwala na genetyczną analizę zarodka przed jego transferem do macicy pacjentki. Brakuje jednak istotnych informacji dotyczących bezpieczeństwa stosowania BB, stosowanej w praktyce klinicznej bez właściwej oceny ryzyka, szczególnie w okresie postnatalnym. Płód, a głównie rozwijający się we wczesnym okresie ciąży mózg są wrażliwe na zaburzenia środowiskowe, które mogą być również skutkiem ART. Badania (Sampino i wsp. Biol.Reprod. 2014) wykazały, że BB może negatywnie wpływać na rozwój postnatalny. Celem pracy jest zbadanie czy sugerowany negatywny wpływ BB jest skutkiem usunięcia blastomeru, czy też reorganizacji wewnętrznej struktury zarodka. Grupami doświadczalnymi będą myszy uzyskane z hodowanych *in vitro* do stadium blastocysty: (1) 8-komórkowych zarodków poddanych BB; (2) zarodków poddanych BB, do których wprowadzony zostanie usunięty uprzednio blastomer; (3) zarodków 16 -komórkowe poddanych dezagregacji i

ponownej reagregacji blastomerów. Kontrolą będą myszy uzyskane z niemanipulowanych zarodków hodowanych *in vitro* oraz zarodków rozwijających się *in vivo*. Zarodki hodowane *in vitro* przeszczepiane będą do samic w ciąży rzekomej. Potomstwo będzie przedmiotem badań behawioralnych oraz klinicznych określających m.in. jego balans energetyczny. W tym celu pozyskane będą od nich pośmiertnie mózg oraz inne główne narządy. Tkanka tłuszczowa poddana będzie testowi Elisa na zbadanie ilości leptyny. Na mózgach wykonana będzie analiza immunohistochemiczna w celu sprawdzenia czy lokalizacja i ilość receptorów leptyny jest taka sama jak w mózgach kontrolnych osobników. Wyniki dostarczą informacji dotyczących bezpieczeństwa stosowania metod ART i mogą również ukierunkować przyszłe badania umożliwiające znalezienie mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie zaburzeń neurorozwojowych i opracowanie nowych strategii terapeutycznych. Klasyfikacja celu badań – Badania podstawowe, Rodzaj badań - Biologia i zachowanie zwierząt; Układ nerwowy

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Liczba myszy: 200szt.

10 samców C57BLxCBA/H poddanych zostanie wasektomii – użyte zostaną one do krycia samic biorczyń zarodków i indukcji u nich ciąży rzekomej.

40 samic Swiss Albino (wiek 3 miesiące) użytych zostanie jako biorczynie zarodków po skojarzeniu z samcami wasektomowanymi.

75 samic C57BLxCBA/H uzyskanych po transferze zarodków pięciu grup

75 samców C57BLxCBA/H uzyskanych po transferze zarodków pięciu grup

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

- **Zastąpienie:** Badanie ukierunkowane na problematykę rozwoju ssaków musza być prowadzone (ze względu na ich specyfikę) wyłącznie na ssaczach modelach zwierzęcych. Gryzonie (mysz) są w tych badaniach oraz w planowanych w tym projekcie modelami najbardziej dogodnymi. Nie ma żadnych metod alternatywnych (np. wykorzystanie linii komórkowych), które można by zastosować do badań nad zarodkami i urodzonym potomstwem. Nie ma również żadnych możliwości uzyskania rozwoju

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

poimplantacyjnego (w tym wytworzenia mózgu) poza organizmem matki, co w przypadku badań będących przedmiotem projektu może być uzyskane jedynie poprzez transfer zarodków do macic biorecipientów.

• **Ograniczenie:** Na podstawie naszych doświadczeń liczba zwierząt została ograniczona do absolutnego minimum. Szczegółowa kalkulacja liczby użytych zwierząt podana została w punkcie 5.A.: 75 samców i 75 samic. Liczba 10 samców wasektomowanych jest minimalną liczbą, którą można użyć do pokrycia samic biorecipientów w czasie przewidywanego okresu prowadzenia prac eksperymentalnych. Wynika to m.in. z tego, że starzeją się one i po około roku ich zdolność do krycia ulega znacznemu ograniczeniu. Z kolei 40 samic biorecipientów będzie podzielonych na 5 grup doświadczalnych, do których przeszczepiane będą zarodki. Do jednej samicy przeszczepianych jest max. 12 zarodków, co przy najlepszej skuteczności transferu (70%) umożliwić może (teoretycznie) uzyskanie w każdej grupie ok. 80 implantacji. Ze względu jednak na to, że nie wszystkie ciąży kończą się porodem oraz część płodów obumiera we wczesnym etapie rozwoju, spodziewać się można, że – w praktyce – uzyskanych zostanie w każdej grupie nie więcej niż 40/50 urodzonych osobników, z których część (zwłaszcza pochodzących z zarodków poddanych manipulacjom) rodzi się martwa lub jest zjadana przez matkę zaraz po porodzie. Przedstawiona kalkulacja opracowana została na podstawie naszych wieloletnich doświadczeń w zakresie rozwoju i rozrodu myszy oraz embriologii eksperymentalnej tego gatunku. Należy zwrócić również uwagę, że narządy wewnętrzne użyte zostaną nie tylko do planowanych projektów, ale będą również udostępnione kolegom z innych placówek naukowych (Dyrektywa 2010/63/UE Rozdz.1 - Art. 18 - wymiana/wspólne wykorzystanie narządów oraz tkanek), co w istotny sposób zmniejszy liczbę zwierząt użytych w tych projektach.

• **Udoskonalenie:** Stosowane procedury są standardowymi procedurami używanymi w embriologii doświadczalnej ssaków. Stosowane podczas czynności przenoszenia zarodków i wasektomii znieczulenie ogólne, a także środki przeciwbólowe oraz zapewnienie zwierzętom po operacji odpowiednich warunków, ograniczają do minimum ich ból, cierpienie i stres. Uśmiercanie zwierząt dokonywane będzie zgodnie z Dyrektywą poprzez dyslokację kręgów szyjnych (dawczyni zarodków). Po zakończeniu badań zwierzęta zostaną poddane eutanazji (dyslokacja kręgów szyjnych). Martwe zwierzęta zostaną oddane do utylizacji.

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

PUBMED oraz Web of Science (JCR)

Wykorzystałam słowa kluczowe:

procedury wspomaganego rozrodu/ bezpieczeństwo ART/ ART i behawior/biopsja blastomerów/ dezagregacja zarodków/ hodowla *in vitro*/ zaburzenia neurorozwojowe.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury, stwierdzam, że brak jest jednoznacznych danych dotyczących wpływu biopsji blastomerów (BB) na rozwój postnatalny i zachowanie urodzonych osobników oraz że nie ma informacji czy sugerowany negatywny wpływ biopsji jest skutkiem usunięcia blastomeru, czy też reorganizacji wewnętrznej struktury zarodka.

Uzyskanie danych z przedstawionego projektu pozwoli na: (1) poznanie wpływu BB na postnatalny rozwój oraz zachowanie potomstwa uzyskanego po BB; (2) dostarczenie informacji dotyczących bezpieczeństwa stosowania metod ART, które mogą ukierunkować przyszłe badania umożliwiające znalezienie mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie zaburzeń neurorozwojowych; (3) opracowanie nowych strategii terapeutycznych.