

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Weryfikacja pluripotencji nowych linii mysich zarodkowych komórek macierzystych”

2. Czas trwania projektu: **15.10.2019-15.10.2022**.....

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): zarodkowe komórki macierzyste pluripotencja, chimery, zarodek.....

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.

Mysie zarodkowe komórki macierzyste (komórki ES; ang. *embryonic stem cells*) są to komórki uzyskiwane z przedimplantacyjnych zarodków myszy w stadium blastocysty. Charakteryzują się one zdolnością do samoodnowy oraz pluripotencją, czyli zdolnością do różnicowania we wszystkie tkanki budujące organizm. Komórki ES są uważane za odpowiednik komórek wężła zarodkowego blastocysty w hodowli *in vitro*. Wiele linii komórek ES, pomimo prawidłowej morfologii i ekspresji markerów pluripotencji, nie posiada pełnego potencjału rozwojowego. Najbardziej wiarygodną metodą pozwalającą wykazać czy dana linia rzeczywiście ma pełen potencjał rozwojowy jest uzyskanie z jej udziałem zdrowych, płodnych zwierząt. Po mikroiniekcji do 8-komórkowego zarodka komórki ES lokalizują się wyłącznie w epiblaście, czyli linii komórkowej, z której powstanie następnie całe ciało zarodka. Po transplantacji takich zarodków do dróg rodnych biorczyń, oprócz osobników chimerowych, czyli zbudowanych zarówno z komórek ES jak i komórek zarodka-gospodarza, można z dużą wydajnością uzyskać zwierzęta „czyste”, złożone wyłącznie z komórek pochodzących z wprowadzanych komórek ES.

Celem doświadczenia jest weryfikacja pluripotencji 14 nowych linii komórek ES, czyli zbadanie ich zdolności do tworzenia osobników chimerowych lub osobników „czystych”, zbudowanych wyłącznie z komórek potomnych ES.

W doświadczeniach wykorzystane zostaną zarodki myszy. Będą one izolowane z układu rozrodczego samic, stymulowanych hormonalnie i uśmiercanych. Zastosowane hormony, indukujące wzrost pęcherzyków jajnikowych i owulację, są substancjami niedrażniącymi. Iniekcje hormonów będą wykonywane w dolnym rejonie brzucha, w miejscu, które nie jest specjalnie uwrażliwione na ból, zatem źródłem bólu będzie jedynie ukłucie igłą. W celu uzyskania urodzonych zwierząt zarodki będą transplantowane do jajowodów samic-biorczyń, pokrytych uprzednio przez samce poddane wazektomii. Transfer zarodków u samic oraz wazektomia u samców będą wykonywane w znieczuleniu ogólnym, a ewentualny ból pooperacyjny będzie uśmierzany środkami przeciwbólowymi.

Przetestowanie nowych linii komórek ES pod kątem pluripotencji umożliwi wykorzystanie tych komórek do badania roli wybranych genów w trakcie rozwoju zarodkowego oraz mechanizmów odpowiedzialnych za zdolności regulacyjne przedimplantacyjnych zarodków myszy.

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

*Mus musculus*, samice F1(C57BL6/Tar x CBA/Tar) – 105

*Mus musculus*, samce F1(C57BL6/Tar x CBA/Tar) – 10

Razem: **115 myszy**

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem w bazie PubMed (wykorzystałam słowa kluczowe: embryonic stem cells, chimaera, embryo, mouse, pluripotency). Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że uzyskane nowe linie komórek ES powinny być każdorazowo przetestowane pod kątem pluripotencji. Wiadomo, że wiele linii komórek ES, pomimo prawidłowej morfologii i ekspresji markerów pluripotencji, nie posiada pełnego potencjału rozwojowego. Wiąże się to prawdopodobnie z istnieniem szeregu aberracji chromosomowych, które zachodzą np. na skutek długotrwałej hodowli *in vitro* czy wielokrotnego pasażowania. Jedynym wiarygodnym testem pozwalającym udowodnić pluripotencję komórek ES jest uzyskanie z ich udziałem zwierząt chimerowych.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na: wykorzystanie pluripotencjalnych linii komórek ES w badaniach dotyczących funkcji różnych genów w rozwoju zarodkowym oraz mechanizmów odpowiedzialnych za regulacyjny charakter rozwoju ssaków.

**Zasada ZASTĄPIENIA:** Utworzenie chimer wymaga wprowadzenia komórek ES do przedimplantacyjnych mysich zarodków uzyskiwanych z dróg rodnych samicy. Nie istnieje obecnie metoda pozwalająca na uzyskanie zarodków bez użycia zwierząt. Przed przystąpieniem do etapu doświadczeń wymagającego użycia zwierząt przetestowaliśmy nowe linie komórek ES innymi dostępnymi metodami. Określiśmy ich kariotyp, obecność markerów pluripotencji oraz zbadaliśmy zdolność do różnicowania w komórki pochodzące z trzech listków zarodkowych w tzw. kulach zarodkowych. Tylko te linie komórek ES, które przeszły pozytywnie testy na pluripotencję *in vitro* (14 z 20), będą badane w testach *in vivo*.

**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 retrospektywną

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