

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Analiza porównawcza zawartości rezerw energetycznych w komórkach rozrodczych różnych gatunków ssaków.**

2. Czas trwania projektu . 1.08.2016 - 31.12.2019.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) lipidy, oocyty, diapauza, zarodki.

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.

Prezentowany projekt odnosi się do fundamentalnej roli lipidów cytoplazmatycznych w oocytach, korelacji między zawartością lipidów w oocytach, a długością cyklu rozrodczego oraz roli lipidów w regulacji diapauzy zarodkowej u różnych gatunków zwierząt udomowionych.

Oocyty różnych ssaków zawierają różne ilości lipidów, a ich rola w oocyocie nie została jeszcze wyjaśniona. Wiadomo jednak, że usunięcie lipidów z zapłodnionego jaja nie wpływa na rozwój zarodka w czasie ciąży. Postawiliśmy więc hipotezę, że lipidy mogą służyć jako źródło energii w czasie diapauzy zarodka (ED). Zakłada się, że lipidy zawarte w oocyocie są niezbędne do przeżycia kilkudniowego zarodka (blastocysty), szczególnie w warunkach kiedy receptywność macicy jest opóźniona, a sam zarodek musi zatrzymać swój rozwój, czekając na odpowiedni sygnał do implantacji. Zjawisko to nazywa się diapauzą zarodkową. Diapauza zarodkowa jest odwracalnym wstrzymaniem rozwoju zarodka na etapie blastocysty w czasie oczekiwania na sygnał gotowości macicy do przyjęcia zarodka. Opisano wystąpienie diapauzy u norek, myszy, królików, bydła i ostatnio u owiec – gatunku uznawanego za niewykazujący diapauzy. Długość diapauzy jest zmienna między gatunkami i może wynosić od kilku dni (mysz domowa) do wielu miesięcy u niektórych mięsożernych (norka). Ilość tłuszczów zgromadzonych w oocytach jest również zależna od gatunku. W oparciu o dwa ostatnie spostrzeżenia sformułowaliśmy hipotezę, że ilość lipidów zgromadzonych w oocyocie, a następnie w zarodku, jest skorelowana z długością cyklu rozrodczego dla danego gatunku oraz/lub z czasem trwania diapauzy.

Przyjęto dwa główne cele badań, realizowane w dwóch podzadaniach.

Podzadanie I . „Badanie zawartości lipidów w oocytach różnych gatunków ssaków.- celem jest określenie związku między ilością lipidów zmagazynowanych w komórkach rozrodczych (oocytach) ssaków, a długością cyklu rozrodczego dla danego gatunku. Nasze wstępne badania potwierdzają, że oocyty zwierząt, u których cykle rozrodcze są krótkie (np. królik, mysz, kot), powinny charakteryzować się niższą zawartością lipidów, niż oocyty gatunków u których cykle są stosunkowo długie (np. norka, lis, pies).

Podzadanie II - celem jest określenie związku między diapauzą zarodkową, a zawartością lipidów w oocytach i określenie roli lipidów we wczesnym rozwoju zarodkowym. W drugim podzadaniu weryfikowana będzie możliwość wystąpienia diapauzy zarodkowej w zarodkach gatunków (królik, owca, lis, tchórz), u których nie występuje to zjawisko w sposób naturalny. Ponadto, podzadanie 2 ma za cel weryfikację czy istnieje możliwość indukcji diapauzy w zarodkach gatunków zwierząt u których naturalnie dochodzi do tego zjawiska (mysz, norka), w układzie kiedy znajdują się one w macicy zwierząt (królik, owca, lis) u których diapauza nie występuje w sposób naturalny.

Projekt klasyfikowany jest do badań podstawowych z zakresu biologii zwierząt.

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

Badania planuje się wykonać na łącznej liczbie 718 zwierząt, 9 gatunków, w tym:

1. 92 królicach i 8 królikach
2. 92 owcach
3. 92 norkach i 8 samcach
4. 92 lisicach
5. 92 tchórzycach i 8 tchórzach
6. 164 myszach i 26 samcach (myszy pochodzą z IGHZ PAN w Jastrzębcu, nr 30)
1. 20 sukach
2. 20 kotkach
3. 20 kozach

W podzadaniu 1. „Badanie zawartości lipidów w oocytach różnych gatunków ssaków.

Układ doświadczenia i liczba zwierząt prezentowana w tabeli 1

Badana będzie zawartość lipidów w oocytach ssaków. Oocyty będą pozyskiwane z jajników przez aspirację lub nacinanie pęcherzyków jajnikowych lub też homogenizację jajników. Od królic, owiec, myszy, norek, lisów i tchórzów jajniki będą pozyskiwane w trakcie realizacji podzadania 2, od kóz z ubojni, a od suk i kotek będą pozyskiwane okazjonalnie w gabinetach weterynaryjnych w trakcie zabiegu sterylizacji tj. będą pobierane w trakcie usługi weterynaryjnej w rozumieniu ustawy z dnia 18 grudnia 2003 r. o zakładach leczniczych dla zwierząt (Dz. U. z 2004 r. Nr 11, poz. 95, z późn. zm.3). Z każdego jajnika planuje się pobrać możliwie dużą ilość oocytów (10 -40), do badań będą kwalifikowane najlepsze oocyty z ciałkiem kierunkowym i niezwyrodniałą cytoplazmą komórkową i wieńcem komórek ziarnistych. Przewiduje się uzyskanie około 30 – 40 oocytów do analizy zawartości lipidów od każdego gatunku, łącznie 270 – 360 oocytów.

W podzadaniu 2. pt. ” Badanie możliwości wywołania diapauzy zarodkowej u ssaków domowych”.

W podzadaniu 2 planuje się wykorzystanie 658 zwierzęta, w tym 624 samice i 34 wazektomizowane samce. Podzadanie będzie podzielone na 6 doświadczeń (po 92 zwierzęta w doświadczeniach 1-5 i 168 w doświadczeniu 6), każde doświadczenie obejmie 6 grup zwierząt – jedną kontrolną po 12 zwierząt i 5 doświadczalnych po 16 zwierząt w grupach doświadczeń 1 – 5 i w doświadczeniu 6: 24 myszy w grupie kontrolnej i po 28 zwierząt w 5 grupach badawczych. Dodatkowo u królików, norek i tchórzów wykorzystane będą po 2 wazektomizowane samce, a u myszy 4 wazektomizowane samce. Każde doświadczenie będzie poświęcone

jednemu gatunkowi. Każde doświadczenie będzie ułożone w taki sam sposób, z następującymi kolejno krokami:

- a) Grupa kontrolna – dawczynie zarodków będą poddane synchronizacji cyklu płciowego i kryte płodnymi samcami tej samej rasy. Pięć dni po pokryciu dawczyniom w znieczuleniu ogólnym będą chirurgicznie usuwane jajniki, u myszy jajniki będą usuwane po 84 godzinach i będzie podawany co 24 godz. progesteron w celu uzyskania diapauzy. Po okresie diapauzy, blastocysty w diapauzie będą uzyskiwane chirurgicznie od dawczyń w znieczuleniu ogólnym, u myszy pośmiertnie. Uzyskane zarodki będą poddawane ocenie morfologicznej i następnie część z nich będzie przenoszona chirurgicznie do zsynchronizowanych biorecipientów tego samego gatunku, a część z nich poddawana analizie zawartości lipidów (10 – 20 każdego gatunku). Samice będą badane w kierunku ciąży aparatem USG. Samice ciężarne będą utrzymywane do porodu i oceniana będzie liczba urodzonych młodych w stosunku do wprowadzonych zarodków.
- b) Grupa doświadczalna – dawczynie zarodków będą poddane synchronizacji cyklu płciowego i kryte płodnymi samcami tej samej rasy płciowego. U owiec, królików, norek, lisów i tchórzy pięć dni po pokryciu od dawczyń w znieczuleniu ogólnym wypłukiwane będą chirurgicznie zarodki w stadium blastocysty, od myszy będą pobierane pośmiertnie. Uzyskane zarodki będą poddawane ocenie morfologicznej i następnie część z nich będzie przenoszona chirurgicznie do zsynchronizowanych biorecipientów innego gatunku, dodatkowo norki, myszy, królice i tchórzycy będą kryte niepłodnymi samcami. Jednocześnie biorecipientom czasowym, podczas chirurgicznego zabiegu przenoszenia zarodków będą usuwane jajniki i będą otrzymywały co 24 godziny progesteron dla uzyskania diapauzy. Po okresie diapauzy, zarodki będą ponownie wypłukiwane i poddawane ocenie morfologicznej. Część uzyskanych zarodków będzie przenoszona chirurgicznie do zsynchronizowanych biorecipientów właściwego gatunku (tego samego co dawczynie blastocyst), a część będzie poddana ocenie zawartości lipidów. Po transferze zarodków samice (biorecipienty) będą badane w kierunku ciąży aparatem USG. Samice ciężarne będą utrzymywane do porodu i do odsadzenia młodych. Oceniana będzie liczba urodzonych młodych w stosunku do wprowadzonych zarodków.

Konieczność wykorzystania tak dużej liczby zwierząt wynika z układu doświadczenia, w którym uwzględnia się bardzo szerokie badania między wieloma gatunkami, (łącznie 39 grup badawczych, 9 w podzadaniu I i 30 w podzadaniu II. Konieczność wykorzystania wielu dawczyń zarodków wynika ze stosowanego powszechnie schematu, według którego na każdą biorecipientkę zarodków uwzględnia się 2 dawczynie zarodków. Schemat ten ma szczególne zastosowanie w przypadku przenoszenia zarodków w stadium rozwojowym blastocysty. Bardzo duże, wieloletnie doświadczenie własne wykonawców i bogate dane literaturowe mówią o stosunkowo niewielkim uzysku blastocyst sięgającym maksymalnie 25 - 30% podczas zabiegu uzyskiwania zarodków w tym stadium rozwojowym. Stąd w doświadczeniu uwzględniono średnio 2 dawczynie na każdą biorecipientkę. Za minimalną liczbę biorecipientów w każdej grupie przyjęto 4. Jest to minimalna liczba biorecipientów pozwalająca na wykonanie wiarygodnych analiz statystycznych i uzyskanie wiarygodnych wyników.

Przewiduje się uzyskanie średnio 10 zarodków od jednej dawczyni u królików, norek, lisów, owiec i tchórzy oraz 5 – 10 od myszy (stąd odpowiednio 2 razy większa liczba myszy niż pozostałych 5 gatunków). Łącznie od wszystkich dawczyń zarodków planuje się uzyskać około 2900 zarodków, z których 180 - 360 będzie poddanych analizie zawartości lipidów (30 – 60 od każdego z 6 gatunków), pozostałe zarodki będą wykorzystane w badaniu *in vivo* i przenoszone do biorecipientów. Uzyskane zarodki będą przenoszone do czasowych obcogatunkowych biorecipientów (po 15 – 25 do każdej biorecipientki) i po okresie diapauzy będą ponownie wypłukane. Przewiduje się uzyskanie maksimum 30% przenoszonych zarodków, czyli około 5 – 8 od każdej czasowej biorecipientki. Zarodki te będą przenoszone do biorecipientów własnego gatunku, średnio około 6 – 10 blastocyst każdej biorecipientki, według przyjętego i opisanego schematu. Ciąża będzie diagnozowana badaniem USG. Ciężarne samice będą obserwowane do porodu i odsadzenia młodych. Wszystkie urodzone i odsadzone zwierzęta będą wprowadzone do systemu hodowlanego. Zwierzęta, na których prowadzono badania będą w miarę możliwości również wprowadzane do systemu hodowlanego lub wykorzystane w kolejnych procedurach.

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

Wnioskodawca posiada znaczną wiedzę i własne doświadczenie dotyczące opisywanej problematyki. Również dane literaturowe, których źródłem były bazy danych takie jak: PUBMED, ScienceDirect i Web of Science potwierdzają zasadność podejmowanych badań. Z danych literaturowych wynika, że oocyty różnych ssaków zawierają różne ilości lipidów, a ich rola w oocyty nie została jeszcze wyjaśniona. Wiadomo jednak, że usunięcie lipidów z zapłodnionego jaja nie wpływa na rozwój zarodka w czasie ciąży (Nagashima i wsp. *Nature* 1995; 374(6521):416; Diez i wsp. *Theriogenology* 2001; 55(4):923-36). Postawiliśmy więc hipotezę, że lipidy mogą służyć jako źródło energii w czasie diapauzy zarodka (ED). ED jest odwracalnym wstrzymaniem rozwoju zarodka na etapie blastocysty w oczekiwaniu na sygnał gotowości macicy do przyjęcia zarodka. Od dawna uważa się, że ED ewoluowała zbieżnie u różnych gatunków (Conaway CH. *Biol. Reprod* 1971; 4: 239-247; Sandell M. Q. *Rev. Biol.* 1990; 65: 23-42; Mead RA. *J. Exp. Zool.* 1993; 266: 629– 641). Z perspektywy ewolucji pogląd, że elastyczność rozwoju oferowana przez ED może być ograniczona jedynie do niewielu gatunków jest jednak dyskusyjny. Blastocysta, która ma ograniczoną zdolność adaptacji w reakcji na wyzwania środowiska, byłaby ewolucyjnie upośledzona. Stąd też, założenie, że tylko niektóre gatunki ssaków mogą z powodzeniem odkładać moment implantacji byłoby krótkowzroczne, w świetle obecnej wiedzy. Wnioskodawca opisał ostatnio wystąpienie ED u owiec – gatunku uznawanego za niewykazujący ED (Ptak i wsp. *PLoS One* 2012; 7:e33027). Zaobserwowano również wystąpienie diapauzy u królików i bydła, po przeniesieniu blastocyst do macicy niereceptywnych myszy (Ptak i wsp. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:92). Długość ED jest zmienna między gatunkami i może wynosić od kilku dni (mysz domowa) do wielu miesięcy u niektórych mięsożernych (norka amerykańska – Mead RA. *Exp. Zool.* 1993; 266: 629–641; Fenelon i wsp. *Int J Dev Biol.* 2014; 58(2-4):163-74). Ilość tłuszczów zgromadzonych w oocytach jest również zależna od gatunku. W oparciu o dwa ostatnie spostrzeżenia sformułowaliśmy hipotezę, że ilość lipidów zgromadzonych w oocyty, a następnie w zarodku, jest skorelowana z długością cyklu rozrodczego dla danego gatunku oraz/lub z czasem trwania ED.

Typ i charakter badań wykluczają możliwość zastosowania badań w warunkach *in vivo*, nie ma więc możliwości zastosowania zasady zastąpienia. Znajduje natomiast zastosowanie zasada ograniczenia. W projekcie uwzględniono najmniejszą możliwą liczbę zwierząt w doświadczeniu, która gwarantuje osiągnięcie przewidzianych celów. Ze względu na niewielką liczebność populacji zastosowane będą odpowiednie narzędzia matematyczne pozwalające na uzyskanie wiarygodnych wyników przy niskich liczebnościach grupy, czyli dla grup typu Small Data. Planuje się wykorzystanie jednego lub kilku pakietów obliczeniowych np. SAS, GNU R, S Plus, Statistica, SPSS lub Stata.c. Analizy te będą prowadzone przez zawodowych statystyków, specjalnie zatrudnionych w projekcie. Zasady 3R odnoszą się do wszystkich zadań, szczególnie znaczenie mają w zadaniu 1, w którym cały materiał pozyskany przyżyciowo zbędzie pochodził z tkanek uzyskanych przy okazji innych procedur lub spoza procedur. W podzadaniu tym żadne ze 180 planowanych zwierząt, dawczyń oocytów nie będzie wykorzystane celowo dla tego podzadania. Wszystkie badania z wyjątkiem myszy będą prowadzone przyżyciowo. W projekcie nie planuje się eutanazji zwierząt hodowlanych po zakończeniu doświadczenia.

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