

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Poszukiwanie genów krytycznych dla oligo i azoospermii u człowieka – mysi model doświadczalny typu knockout**
2. Czas trwania projektu 08.05.2017-28.02.2022
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **męska niepłodność, azoospermia, plemniki**
4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) **B**
5.
  - 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

Celem badań jest przeprowadzenie analizy genów – mysich homologów genów ludzkich, odpowiedzialnych za zaburzenia procesu powstawania plemników, skutkujące obniżeniem ich liczby (do całkowitego braku).

Najnowsze wyniki badań oraz informacje zebrane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) wymieniają niepłodność jako chorobę społeczną, która dotyczy ok. 10-18% par. Szacuje się, że udział tzw. czynnika męskiego w niepłodności małżeńskiej to obecnie 40-60% wszystkich przypadków. Oprócz częstszego występowania aberracji chromosomowych u niepłodnych mężczyzn, niepowodzeniom rozrodu towarzyszą często obniżone parametry nasienia. Jednym z nich jest liczba plemników w ejakulacie, która może być obniżona (oligozoospermia), a nawet zredukowana do ich całkowitego braku (azoospermia). Częstość występowania azoospermii szacuje się na ok. 1% ogólnej populacji mężczyzn, przy czym odsetek ten wzrasta do wartości 10-15% u mężczyzn niepłodnych. Wydaje się to być zatrważające, szczególnie w świetle faktu niżu demograficznego krajów rozwiniętych, których ten problem dotyczy.

U człowieka oprócz standardowej analizy nasienia, w diagnostyce niepłodności analizuje się poziom hormonów, kariotyp oraz mikrodelecje w chromosomie Y lub mutacje w genie CFTR. Ponadto, w przypadku azoospermii (braku plemników) przeprowadza się analizę tkanek jądra. W przypadkach złożonych przyczyn obserwowanych zaburzeń, taka diagnostyka okazuje się niewystarczająca. Dlatego ważne jest, aby znaleźć bardziej wiarygodny prognostyczno-diagnostyczny algorytm postępowania. W tym celu podejmuje się próby identyfikacji oraz charakterystyki genów krytycznych dla powstawania męskich komórek rozrodczych. A to mogłyby być wykorzystane jako markery molekularne w diagnostyce męskiej niepłodności. Istotnym elementem badań nad męską niepłodnością są badania *in vivo* z

wykorzystaniem mysiego modelu typu knockout - czyli modelu w którym wybrane geny zostają sztucznie wyłączone.

Wyselekcjonowane geny stanowiąc będą kolejną, intensywnie rozwijającą się część badań nad męską spermatogenezą w ujęciu modelowym. Otrzymane wyniki pozwolą odpowiedzieć na pytanie o występowanie różnic fenotypowych u rodzeństwa z tą samą mutacją oraz poznać kolejne geny krytyczne dla uwarunkowania liczby plemników. Ponadto, znakomicie wpiszą się w badania funkcjonalne spermatogenezy prowadzone w laboratoriach na świecie i uzupełnią listę genów scharakteryzowanych i krytycznych dla spermatogenezy.

Planowany przebieg badań: po przebyciu kwarantanny w celu aklimatyzacji, zwierzęta poddane zostaną:

1. Sprawdzeniu potencjału rozrodczego samców z knockoutami genowymi poprzez krzyżowanie z samicami typu dzikiego (bez knockoutów), pokolenie F0 - obserwacja ilości i liczebności potencjalnych miotów. 2. Genotypowaniu potomstwa z pokolenia F1 - w kierunku potwierdzenia/wykluczenia występowania badanego knockoutu genowego. 3. Eutanazji zwierząt - myszy z pokolenia F0 oraz F1: uśpienie zwierząt CO<sub>2</sub> w komorze do tego przeznaczonych, w dawce do uśpienia. Nie przewiduje się wcześniejszej eutanazji zwierząt, gdyż zastosowane knockouts genowe dotyczą wyłącznie tkanki jądra – geny te ulegają ekspresji wyłącznie w jądrze. Gdyby jednak taka potrzeba była, to ze względu na dobro zwierząt poddane one zostaną natychmiastowej eutanazji poprzez uśpienie w komorze z CO<sub>2</sub>. Zwierzęta nadmiarowe – tj. te z pokolenia F1, które w wyniku krzyżowania nie będą posiadały knockoutów genowych (samce i samice), będą utrzymywane w ośrodku do ich naturalnej śmierci (nie planuje się ich wykorzystania w innej procedurze). Nie jest możliwe wydanie zwierząt do adopcji ze względu na fakt, iż jedno z ich rodziców (ojciec) jest GMO. Nie przewiduje się również żadnej sytuacji mogącej wywołać jakiegokolwiek szkody bądź dystres u wymienionych zwierząt.

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

Myszy C57Bl/6J z knockoutami genowymi (pokolenie F0 - 20 samców, pokolenie F1 - maks. 20 zwierząt) oraz 50 myszy C57Bl/6J bez knockoutów (30 samic oraz 20 samców).

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

Przygotowując projekt badawczy, sprawdzono istniejący stan wiedzy w zakresie objętym wnioskiem badawczym w bazach: PubMed, ScienceDirect, Knockout Mouse Project (KOMP) Repository, Mouse Genome Informatics JAX, International Mouse Strain Resource (IMSR) oraz IMPC International Mouse Phenotyping Consortium. Wykorzystano następujące słowa kluczowe: mouse knockout model, male spermatogenesis, murine spermatogenesis, azoospermia, oligozoospermia, gene mutation in spermatogenesis oraz nazwy genów badanych w projekcie.

Na podstawie przeglądu istniejącej literatury oraz danych dotyczących zwierząt laboratoryjnych, stwierdzono, że mysi model doświadczalny typu knockout jest najlepszym wyborem przy badaniu zaburzeń męskiego układu rozrodczego u człowieka pod kątem genetycznym.

- A. A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala stwierdzić, że mysi model doświadczalny jest z powodzeniem wykorzystywany w badaniach genów potencjalnie związanych z ludzką

spermatogenezą.

- B. B. Brak jest danych dotyczących funkcji genów sugerowanych w niniejszym projekcie, *stricte* pod kątem obniżonej (braku) liczby plemników u mężczyzn, będącej jedną z przyczyn niepłodności.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na poznanie funkcji kolejnych czterech kandydujących genów jako kluczowych dla liczby plemników w ejakulacie, stanowiących podstawowy warunek płodności człowieka.

- A. A. Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku badania przyczyn niepłodności męskiej, znakomicie wpisze się w nurt światowych badań nad niepłodnością oraz uzupełni listę genów już poznanych i istotnych dla procesu powstawania męskich komórek rozrodczych.
- B. B. Zastosowanie uzyskanej wiedzy będzie polegać na stworzeniu panelu genów krytycznych dla azoospermii/oligozoospermii, co pozwoli na przygotowanie testu genetycznego poprawiającego diagnostykę niepłodności męskiej.

C.

ZASTĄPIENIE: Myszy stanowią gatunek o możliwie najniższym stopniu rozwoju, który może odzwierciedlać funkcjonowanie ludzkich genów (wysoka homologia). Ponadto, zastosowanie mysiego modelu typu knockout pozwala na pominięcie badań na naczelnych. Jedynie badania *in vivo* oraz *post mortem* na tkankach pozwolą na otrzymanie odpowiedzi na zadane pytanie o funkcję wybranych genów (dotąd nieopisanych) w determinacji liczby plemników u człowieka. Należy wspomnieć, że myszy, stanowią popularny i szeroko stosowany gatunek do badań funkcji genów w chorobach człowieka.

OGRANICZENIE: Liczba wykorzystanych zwierząt została ograniczona do minimalnego poziomu umożliwiającego poprawną interpretację wyników zarówno metodami badawczymi, jak również pod kątem powtarzalności wyników. Wszystkie czynności wobec zwierząt będą wykonywane przez przeszkolone osoby z wieloletnim doświadczeniem w pracy ze zwierzętami. Zwierzęta użyte do projektu pochodzą będą z certyfikowanych hodowli.

DOSKONALENIE: Zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku, w pomieszczeniach zwierzętarni. Metody badawcze zostały tak dobrane, aby ograniczały do minimum/eliminowały ból i cierpienie – kategoria dotkliwości procedur nie przekracza kategorii łagodnej. Zastosowana metodyka obejmuje techniki doskonale opracowane, stąd odczuwanie stresu czy dyskomfortu przez myszy zredukowane będzie do minimum. Zaplanowane czynności doświadczalne obejmują: obserwację ilości i liczebności potencjalnych miotów wynikających z krzyżowania samców z knockoutem z samicami bez knockoutów (pokolenie F0); potwierdzenie/wykluczenie występowania badanego knockoutu genowego (genotypowane) u potomstwa z pokolenia F1; eutanazję zwierząt poprzez uśpienie zwierząt CO<sub>2</sub> w komorze do tego przeznaczonej, w dawce do uśpienia. Nie przewiduje się wcześniejszej eutanazji zwierząt, gdyż zastosowane knockauty genowe dotyczą wyłącznie tkanki jądra. Gdyby jednak taka sytuacja miała miejsce, to ze względu na dobro zwierząt, poddane one zostaną natychmiastowej eutanazji poprzez uśpienie w komorze z CO<sub>2</sub>.