

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Badanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za regulację lipolizy w chorobach metabolicznych**

2. Czas trwania projektu **5 lat**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **lipoliza, MK5, MAPK6, metabolizm**

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.

Choroby metaboliczne, do których zaliczane są m.in. cukrzyca typu 2, oporność na insulinę, otyłość oraz choroby układu krążenia, to jedne z najczęściej występujących schorzeń cywilizacyjnych na świecie. Szacuje się, że obecnie w Polsce na cukrzycę typu 2 cierpi około 3 miliony osób, natomiast otyłość występuje u ponad 10 milionów ludzi. Badania ostatnich lat wykazały, że zaburzenia procesu lipolizy odgrywają znaczącą rolę w rozwoju chorób metabolicznych, jednak dokładny mechanizm odpowiadający za regulację tego procesu nie jest jeszcze poznany. Lepsze zrozumienie jakie czynniki wpływają na proces lipolizy przyczyni się do opracowania skutecznych terapii w leczeniu i zapobieganiu chorobom metabolicznym. Wyniki uzyskane w naszej pracowni sugerują, że kinaza aktywowana mitogenami 6 (MAPK6) oraz aktywowana MAP kinazami białkowa kinaza 5 (MAPKAPK5, inaczej MK5), bezpośrednio aktywowana przez białko MAPK6, mogą odgrywać kluczową rolę w regulacji procesu

lipolizy w adipocytach. Dlatego też, w oparciu o uzyskane przez nas wstępne wyniki, postawiliśmy hipotezę, że ścieżka sygnałowa MAPK6/MK5, poprzez regulację procesu lipolizy w tkankach obwodowych, zaangażowana jest w patogenezę chorób metabolicznych.

Głównym celem naszego projektu jest określenie komórkowych i molekularnych mechanizmów regulujących proces lipolizy w chorobach metabolicznych. Szczegółowe cele to określenie roli kinazy MAPK6 oraz MK5 w rozwoju chorób metabolicznych oraz określenie molekularnych mechanizmów poprzez który białka te regulują proces lipolizy w tkankach obwodowych.

W celu określenia zależności pomiędzy aktywacją ścieżki sygnałowej MAPK6/MK5 a lipolizą w tkankach obwodowych, wykorzystane zostaną myszy z globalnym oraz tkankowo specyficznym nokautem genu kodującego kinazę MAPK6 lub MK5 w tkance tłuszczowej białej i brązowej oraz mięśniach szkieletowych, a także myszy transgeniczne z podwyższoną ekspresją genu kodującego MK5 w wyżej wymienionych tkankach. Żadna z opisanych powyżej modyfikacji genetycznej nie powoduje szkodliwego fenotypu u myszy, co potwierdzono w Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine na Uniwersytecie w Würzburgu. W celu zaindukowania nokautu w przypadku myszy z nokautem indukowanym, zwierzętom przez okres 10 dni będzie podawany tamoksifen. Tak krótki czas podawania tamoksifenu nie wywołuje szkodliwych efektów ubocznych u myszy. W eksperymencie 1. zwierzęta będą karmione przez okres 24 tygodni standardową dietą laboratoryjną oraz dietą wzbogaconą w tłuszcz. W trakcie trwania eksperymentu 1. przeprowadzony zostanie test tolerancji glukozy, test wrażliwości na insulinę, określanie poziomu insuliny stymulowanej glukozą, badanie tempa metabolizmu z użyciem klatek metabolicznych, oraz określanie zmian stężenia glukozy, lipidów i białek we krwi pod wpływem głodzenia. W celu dalszej analizy procesu lipolizy przeprowadzony zostanie eksperyment 2, w którym przez okres 14 dni we krwi myszy badane będą zmiany stężenia glukozy i lipidów pod wpływem agonisty receptora β_3 -adrenergicznego CL-316243. Podczas trwania eksperymentu 2. przeprowadzone zostanie również badanie tempa metabolizmu z użyciem klatek metabolicznych oraz określanie stężenia glukozy, lipidów i białek we krwi pod wpływem głodzenia. Tkanka tłuszczowa biała i brunatna, wybrane mięśnie szkieletowe oraz krew będą pobierane po wcześniejszym uśmierceniu zwierząt zarówno z eksperymentu nr 1, jak i nr 2. Planowane procedury wykorzystania zwierząt zaliczane są do umiarkowanej kategorii dotkliwości. Najbardziej dotkliwymi czynnościami w zaproponowanych doświadczeniach są: pobieranie krwi z ogona oraz głodzenie. Maksymalny czas trwania głodzenia to 24 h, w tym czasie zwierzęta mogą czuć lekki dyskomfort, jednak

jest to za krótki czas, aby myszy zaczęły odczuwać poważne fizyczne dolegliwości z powodu braku pożywienia. Pobieranie krwi z ogona również może powodować dyskomfort u myszy, jednak ze względu na pobieranie bardzo małych objętości (do 20 μ l) ta procedura również zalicza się do umiarkowanej kategorii dotkliwości. Klasyfikacja doświadczenia: PB10. Badania podstawowe. Układ wewnętrzny lub metabolizm.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Mysz domowa: 2480 osobników.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, sprawdziłem istniejącą wiedzę dotyczącą zagadnienia przedstawionego we wniosku badawczym, w takich dostępnych bazach danych jak: PUBMED; Google Scholar oraz ScienceDirect.

Wykorzystane zostały takie słowa kluczowe jak: metabolic disorders / insulin resistance / obesity / diabetes / lipotoxicity / lipolysis / lipid metabolism / MAPK6 / MAPKAPK5 / MK5 / ERK3 / β 3 adrenergic receptor / CL-316243.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że brak jest danych naukowych dotyczących roli ścieżki sygnałowej MAPK6/MK5 w regulacji lipolizy w chorobach metabolicznych.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących proces lipolizy w zaburzeniach metabolicznych, co może w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych terapii w leczeniu i zapobieganiu chorobom metabolicznym.

W niniejszym wniosku wnosimy o liczebność zwierząt wynoszącą 20 zwierząt/grupę eksperymentalną. Jest to minimalna ilość zwierząt pozwalająca na uzyskanie odpowiedniej ilości materiału do badań celem

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

przeprowadzenia kompletnego zestawu zaplanowanych analiz oraz statystycznej wiarygodności wyników. Niemniej jednak, jeżeli uzyskamy odpowiednią ilość materiału do analiz bądź uzyskamy wystarczającą ilość danych eksperymentalnych przy użyciu mniejszej liczby myszy, to pozostałe zwierzęta nie zostaną przez nas wykorzystane.

W zaplanowanym projekcie istnieje szereg doświadczeń/analiz, do których nie będą wykorzystane zwierzęta. Z wykorzystaniem modeli *in vitro*, tj. stabilnych linii komórkowych adipocytów (3T3-L1 oraz SGBS) i mioblastów (C2C12), prowadzone będą badania funkcjonalne, testy aktywności enzymów, jak również analiza biochemiczna oraz proteomiczna.

Jednakże badania z wykorzystaniem linii komórkowych nie odzwierciedlają pełnego tła metabolicznego organizmu oraz interakcji między różnymi rodzajami komórek w tkankach i narządach, niezbędnego dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych i biochemicznych. Co więcej, linie komórkowe charakteryzują się odmiennym profilem genowym oraz białkowym od tkanek. Z tego względu uzyskane w doświadczeniach *in vitro* wyniki mogą okazać się specyficzne wyłącznie dla testowanej linii komórkowej i nie będą opisywać trafnie badanych przez nas zaburzeń metabolicznych. Ponieważ celem naszych badań jest zbadanie roli MAPK6 oraz MK5 w rozwoju chorób metabolicznych wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych wydaje się konieczne. W celu minimalizacji stresu u wykorzystanych zwierząt, przewiduje się odpowiedni czas rekonwalescencji po poszczególnych testach metabolicznych.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

TAK - na podstawie art. 53 ust. 1 ustawy

TAK - na podstawie art. 53 ust. 3 ustawy

NIE

² Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.