

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Wyjaśnienie mechanizmu indukowanej lipidami insulinooporności wątrobowej**

2. Czas trwania projektu **od 10/2020 do 03/2023**

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **insulinooporność, dieta, wątroba, plazmidy, lipidy**

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.

Otyłość, insulinooporność i cukrzyca typu 2 są jednymi z głównych przyczyn umieralności w krajach rozwiniętych. Wzrost zachorowań na otyłość i cukrzycę typu 2 pomiędzy rokiem 2000 a 2050 określa się na 437% u mężczyzn i 271% u kobiet, z łączną liczbą chorych w 2050 powyżej 700 milionów. Różnice względem płci spowodowane są odmienną gospodarką hormonalną u kobiet i mężczyzn oraz innym rozkładem tkanki tłuszczowej, która w przypadku mężczyzn akumuluje się głównie w tkance trzewnej oraz wątrobie. Mając na uwadze obecne oraz projektowane ekonomiczne, społeczne oraz zdrowotne koszty epidemii cukrzycy typu 2 kluczowym aspektem jest identyfikacja biologicznych mechanizmów prowadzących do tej choroby. Poprzedni eksperyment (LKE 44/2018) został wykonany na samicach szczepu C57BL6/J. Zważywszy na kluczowe różnice w metabolizmie lipidów oraz narażeniu na cukrzycę typu 2 i jej komplikacje występujące pomiędzy kobietami a mężczyznami, zasadnym jest przeprowadzenie proponowanych eksperymentów na samcach.

Celem proponowanych badań jest ustalenie, które z lipidów wątrobowych odgrywają najważniejszą rolę w indukcji insulinooporności u samców myszy karmionych dietą bogatotłuszczową. Kluczowym

aspektem badań będą procedury wyciszania genów w wątrobie z użyciem metody hydrodynamicznej (HDG) oraz infuzji kwasów tłuszczowych i glukozy znakowanej stabilnym (nieradioaktywnym) izotopem węgla  $^{13}\text{C}$  (Czynność 12). HDG jest standardową procedurą dostarczania materiału generycznego do wątroby, którą jako bezpieczna i efektywna jest z powodzeniem stosowana u gryzoni (mysz itp.) dużych ssaków (świnie) oraz naczelnych. Obecnie trwają prace nad zastosowaniem HDG w terapii ludzi. Powyższe procedury umożliwią ustalenie roli poszczególnych grup lipidów w indukcji cukrzycy, co pozwoli na identyfikację nowych celów terapii farmakologicznej i genetycznej u ludzi.

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

Eksperyment zostanie przeprowadzony na 85 samcach myszy C57BL6/J

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

W trakcie projektowania badań przeprowadzono dogłębną analizę stanu wiedzy o indukowanej diecie insulinooporności wątrobowej oraz procedur eksperymentalnych wykorzystywanych w tym obszarze badawczym w oparciu o ogólnodostępne bazy danych (PUBMED, ScienceDirect, Web of Science (JCR) Google Scholar). Zastosowano słowa kluczowe związane z indukcją insulinooporności, hodowlami komórkowymi, infuzjami, hydrodynamicznym dostarczaniem genów (HDG) oraz alternatywami dla powyższych procedur. Zgodnie z zasadą 3R analizę przeprowadzono w celu potencjalnego całkowitego zastąpienia zwierząt hodowlami komórkowymi, ograniczeniem liczby zwierząt poddanych poszczególnym procedurom oraz zmniejszeniem stresu związanego z danymi procedurami eksperymentalnymi, w szczególności HDG oraz infuzją.

**Zastąpienie:** Badania nad indukcją insulinooporności w hodowlach komórkowych oparte są o immortalizowane lub nowotworowe linie komórek wątrobowych (HEPG2; AML12). Najnowsze badania z użyciem technik wielkoskalowych (genomika, proteomika, metabolomika) udowodniły, że linie komórkowe posiadają znacząco odmienny od komórek wątrobowych profil molekularny, bardziej zbliżony do komórek nowotworowych. Linie komórkowe nie posiadają wielu cech zróżnicowanych hepatocytów jak i niską ekspresję typowych genów prawidłowo funkcjonującej tkanki wątrobowej (produkcja albumin, glukoneogeneza, sekrecja lipoprotein). Dodatkowo wzięto pod uwagę przeprowadzenie eksperymentów na pierwszorzędowych hepatocytach wyizolowanych z wątroby myszy z nadwyręzek hodowlanych (pobranie jedynie tkanki wątrobowej) oraz z doświadczenia, którym zastosowano by jedynie karmienie dietą standardową i bogatotłuszczową z późniejszą modyfikacją komórek z użyciem plazmidów. Z tego podejścia zrezygnowano ze względu na znacząco niższą skuteczność transfekcji plazmidami w hodowlach komórkowych w porównaniu z metodą HDG, co uniemożliwiło by obserwację efektów terapeutycznych (zwiększenia insulinooporności) w wyniku nieznacznego wyciszenia genów. Zastosowanie bardziej skutecznych krótko działających siRNA nie

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

pozwoliłoby na obserwację długofalowych efektów wyciszenia, wymaganych do modyfikacji metabolizmu lipidów. Hodowle komórkowe nie pozwoliłyby także na obserwację poprawy insulinowrażliwości na poziomie całego organizmu w wyniku modyfikacji pojedynczego genu metabolizmu lipidów w wątrobie, także ze względu na wpływ szeregu czynników humoralnych (występujących we krwi), które nie mogą być w pełni symulowane w warunkach hodowli komórkowych. Dlatego też stwierdzam, że nie jest możliwe w pełni zastąpienie hodowlami komórkowymi proponowanych badań.

**Redukcja:** W imię zasady redukcji, zastosowano szereg środków umożliwiających zmniejszenie liczebności zwierząt. Planowane jest wykonanie badań na samcach myszy C57BL6/J (JACKSON), szczególnie podatnych na indukcję insulinooporności w wyniku karmienia dietą bogatotłuszczową. Linia myszy C57BL6/J jest utrzymywana w sposób zapobiegający dryfowi genetycznemu, w wyniku którego szereg szczepów myszy – w tym także innych hodowli C57BL6 - rozdziela się fenotypowo na osobniki wykazujące odmienną wrażliwość na dietę bogatotłuszczową. Użycie innego szczepu myszy wymagałoby znacznego powiększenia grup eksperymentalnych w celu selekcji zwierząt insulinoopornych przed przystąpieniem do głównego eksperymentu. Natomiast skuteczna indukcja insulinooporności w szczepach o innym profilu genetycznym oprócz karmienia dietą bogatotłuszczową wymaga zastosowania niskich dawek streptozotocyny (środka uszkadzającego komórki  $\beta$  trzustki) związanych z prowadzeniem dodatkowej procedury. Dlatego też uważam, że zastosowanie myszy C57BL6/J umożliwia wprowadzenie do eksperymentu najniższej liczby zwierząt i uzyskanie wyników najbardziej zbliżonych do tych obserwowanych w u ludzi.

Liczebność grup eksperymentalnych została ustalona w oparciu o wyniki z poprzednich eksperymentów przeprowadzonych u myszy szczepu C57BL/6 karmionych dietą bogatotłuszczową oraz przegląd najnowszych danych z innych zespołów badawczych (literatura) wykorzystujących myszy szczepu C57BL6J do badań nad insulinoopornością. Do analizy mocy oraz liczebności grup wykorzystano dane zmienności parametru HOMA-IR (wskaźnik insulinooporności), wątrobowej zawartości diacyloglicerolu i ceramidu (lipidy wątrobowe) oraz fosforylacji kinazy AKT (białko szlaku insulinowego). Analiza liczebności wykazała, iż optymalna liczebność grup eksperymentalnych dla  $p < 0.05$  i mocy 90% wynosi 6 dla parametru HOMA-IR, 8 dla lipidów wątrobowych oraz 10 dla analizy WB. Analiza literatury wykazała, iż wielkość grupy eksperymentalnej wahała się od 6 do 20 osobników w grupie w przypadku badań wykorzystujących indukowaną dietą insulinooporność.

Zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystanych w eksperymencie umożliwi także przeprowadzenie testów tolerancji glukozy (OGTT) oraz insuliny (ITT) na tych samych osobnikach. Testy zostaną przeprowadzone w tygodniowym odstępie czasu, co umożliwi redukcję stresu i powrót zwierząt do parametrów wyjściowych. Wszystkie czynności na grupie zwierząt z OGTT i ITT mają charakter łagodny, co nie pogorszy znacząco ich dobrostanu. Jednoczesne zwiększenie liczebności grup eksperymentalnych o dodatkowe 10% zapewni uzyskanie wiarygodnych wyników w przypadku zdarzeń losowych takich jak nieudana lub niepełna infuzja lub niekorzystny przebieg HGD.

**Udoskonalenie:** Zgodnie z zasadą udoskonalenia procedury eksperymentalne zostały odpowiednio zmodyfikowane w celu zmniejszenia cierpienia i stresu zwierząt z jednoczesnym zapewnieniem pozyskania danych o wysokiej jakości. Dotyczy to w szczególności procedury hydrodynamicznego dostarczania genów do tkanki wątrobowej (HGD) oraz infuzji do żyły ogonowej. Pomimo dobrej tolerancji HGD u zwierząt świadomych, cechującej się szybkim powrotem zwierząt do typowych zachowań (apetyt, aktywność, brak oznak stresu w ok. 10 minucie po HDG) oraz braku efektów długofalowych, procedurę planujemy obecnie przeprowadzić w narkozie izofluranowej. Z naszych

uprzednich doświadczeń z HDG wynika, iż okres 20 minut jest wystarczający do prawidłowego przeprowadzenia procedury oraz powrotu zwierzęcia do aktywności. W najnowszych publikacjach procedura HDG u myszy wykonywana jest zgodnie z proponowanym schematem postępowania także pod narkozą izofluranową. Procedura HDG pod narkozą izofluranową cechuje się umiarkowanym stopniem inwazyjności a odsunięcie jej w czasie od głównego eksperymentu zapewni zmniejszenie negatywnych efektów anestezji na metabolizm glukozy, insuliny i kwasów tłuszczowych. Dodatkowo w celach prewencyjnych (analgezja) przez pierwsze 24h zostanie podany karprofen (NLPZ) w wodzie pitnej w dawce 0.05mg/ml.

Infuzja związków znakowanych stabilnym (nieradioaktywnym) izotopem węgla jest szeroko stosowana w badaniach in-vivo (także u ludzi). Umożliwia ona precyzyjne badanie metabolizmu związków takich jak kwasy tłuszczowe i glukoza. W proponowanych badaniach wykorzystana zostanie infuzja kwasów tłuszczowych oraz glukozy poprzez żyłę ogonową u zwierząt przystosowanych do przebywania w jednostce ECU (enviromental conditioning unit). Poprzednia wersja eksperymentu zakładała dootrzewnowe podanie insuliny oraz pentobarbitalu zwierzętom przebywającym w jednostce ECU. W przypadku zastosowania ECU zwierzęta wymagają częściowego unieruchomienia przez okres infuzji (2h) a stopniowa aklimatyzacja do wymaganych warunków przeprowadzana jest w ciągu kilku tygodni poprzedzających eksperyment. W ramach udoskonalenia procedury infuzji i eutanazji zarówno insulina jak i pentobarbital zostaną podane poprzez linię infuzyjną w celu zminimalizowania dyskomfortu związanego z iniekcją dootrzewnową pentobarbitalu oraz podwójnego ukłucia igłą. Wziewne środki znieczulające takie jak izofluran oraz niektóre podawane w formie iniekcji (ketamina/ksylazyna) wywołują znaczące zmiany w metabolizmie glukozy i insuliny przy długotrwałej anestezji, co wpływa na jakość otrzymanych wyników. Negatywny efekt anestezji na metabolizm glukozy obserwowany jest dla wszystkich środków anestezjologicznych, jednakże znacząco zależy on od rodzaju związku. Przegląd najnowszej literatury pozwolił na identyfikację pentobarbitalu jako związku o najmniejszym wpływie na metabolizm glukozy, insuliny i kwasów tłuszczowych, pod wpływem którego zwierzęta cechują się zbliżoną odpowiedzią na insulinę i glukozę (krzywe OGTT i IPTT) oraz wykazują nieznaczne zmiany w HOMA-IR. Pentobarbital zostanie wykorzystany jako środek do eutanazji przy podaniu dożylnym poprzez linię infuzyjną, co zminimalizuje do zera dyskomfort wywołany iniekcją tego związku do jamy otrzewnowej.

Sano Y, Ito S, Yoneda M, et al. Effects of various types of anesthesia on hemodynamics, cardiac function, and glucose and lipid metabolism in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311(6):H1360-H1366.

Fang X, Xia T, Xu F, et al. Isoflurane aggravates peripheral and central insulin resistance in high-fat diet/streptozocin-induced type 2 diabetic mice. *Brain Res*. 2020;1727:146511.

Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E, Barlow R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. *Vis Neurosci*. 2005;22(5):615-618.

Windeløv JA, Pedersen J, Holst JJ. Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice. *Physiol Rep*. 2016;4(11):e12824. doi:10.14814/phy2.12824.

Inne procedury takie jak znakowanie/kolczykowanie i implantacja linii infuzyjnej zostaną przeprowadzone w szybko indukowalnej, lekkiej narkozie izofluranowej, co znakomicie zredukuje stres związany z chwytem i kolczykowaniem uszu a jednocześnie nie wpłynie na uzyskane wyniki ze względu na znaczną odległość czasową pomiędzy procedurami a głównym eksperymentem.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną<sup>2</sup>

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

---

<sup>2</sup> Wypełnia właściwa lokalna komisja etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach. Należy zaznaczyć właściwe pole.