

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: „Interakcje i funkcje oksytocyny i kisspeptyny u szczurzy z indukowaną cukrzycą typu 2”

2. Czas trwania projektu: 4.11.2019 r. – 3.11.2023 r.

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): oksytocyna, kisspeptyna, cukrzyca typu 2, podwzgórze

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 i cukrzyca mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonowania układu rozrodczego. Naukowcy starają się wyjaśnić procesy fizjologiczne leżące u podstaw otyłości i/lub cukrzycy typu 2, by móc w przyszłości opracować skuteczniejsze terapie mające na celu redukcję masy ciała, a tym samym ryzyka wystąpienia chorób towarzyszących otyłości. Jedną z potencjalnych broni w walce z otyłością okazać się może hormon – oksytocyna (OXT). Dotychczas wykazano, że podawanie OXT redukuje masę tkanki tłuszczowej. Jednym z czynników pełniących kluczową rolę w regulacji zdolności rozrodczych organizmu jest kisspeptyna (KP). Zarówno w otyłości, jak i w niedożywieniu dochodzi do obniżenia poziomów KP w podwzgórzu, co skutkować może zmniejszeniem zdolności reprodukcyjnych organizmu. Wykazano również, że zaburzenia w produkcji KP występują u zwierząt z zaindukowaną cukrzycą. Ponadto, pokazano rolę KP nie tylko w mózgu, ale – podobnie jak OXT – w tkankach związanych z metabolizmem (trzustce, wątrobie, tkance tłuszczowej). Najnowsze badania pokazują, że receptory dla KP obecne są na neuronach uwalniających OXT zlokalizowanych w jądrze

przykomorowym podwzgórza, a także że neurony KP i OXT kontaktują się z sobą. Dlatego oba peptydy mogą „współpracować” w regulacji gospodarki energetycznej organizmu. Celem naukowym projektu jest zatem zbadanie, w jaki sposób cukrzyca typu 2 wpływa na dwa ważne peptydy, jakimi są OXT i KP, oraz interakcje pomiędzy nimi.

Przewidywane korzyści: realizacja tego projektu może przyczynić się do wypełnienia luki w aktualnym stanie wiedzy, dotyczącej różnic płciowych w odpowiedzi obu peptydów na cukrzycę typu 2. Ponadto, projekt ten przyczyni się do lepszego poznania zależności pomiędzy gospodarką hormonalną a masą ciała. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do edukacji społeczeństwa w zakresie cukrzycy i jej prewencji oraz pomóc we wdrożeniu nowych metod leczenia cukrzycy i/lub chorób współistniejących (otyłość, zaburzenia płodności).

W eksperymencie proponowane są jedna grupa eksperymentalna (DM2) oraz jedna grupa kontrolna (K). Po tygodniu aklimatyzacji zwierzęta z grupy eksperymentalnej będą otrzymywać dietę wysokotłuszczową, zaś samice z grupy K standardową dietę laboratoryjną. Po 16 tygodniach otrzymywania odpowiednich diet, u zwierząt z grupy DM2 zostanie wywołana cukrzyca typu 2. Następnie w każdej z grup zostaną wyodrębnione dwie podgrupy – samice, którym wszczepiona zostanie pompa osmotyczna z OXT oraz kontrolne, którym zostanie wszczepiona pompa osmotyczna z solą fizjologiczną.

W czasie trwania całego doświadczenia uwzględnione zostaną zasady 3R, tj. zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia. Szkody wynikające z eksperymentu: cierpienie i/lub dystres zwierząt, jakimi są iniekcje dootrzewnowe, czy umieszczanie implantów z hormonem, a także śmierć zwierząt (eutanazja). Szkodą dla zwierząt mogą być również możliwe następstwa wywołania cukrzycy – hyperglikemia przy jednoczesnej hypoinsulinemii. W zaawansowanych przypadkach choroby stany te mogą zagrażać życiu zwierząt. Ponadto, podczas stosowania diety wysokotłuszczowej u zwierząt mogą wystąpić biegunki.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

80 dojrzałych płciowo samic szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*) Wistar, stado niekrewniacze

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Podczas przygotowania niniejszego projektu sprawdzono dotychczas istniejące osiągnięcia i wiedzę z zakresu wpływu podawania oksytocyny na takie stany metaboliczne jak otyłość oraz cukrzyca typu 2. Ponadto, zrobiono przegląd dostępnej literatury fachowej pod kątem wpływu podawania oksytocyny na kisspeptynę oraz interakcji pomiędzy tymi peptydami. Korzystano z ogólnodostępnych baz danych literaturowych takich jak: PubMed, Google Scholar czy Web of Science. Na podstawie dokonanej

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

analizy literatury uzyskano pewność, że badania proponowane w niniejszym projekcie są innowacyjne, mogą mieć wpływ na rozwój nauki i uzyskanie wiedzy w danym zakresie tematycznym oraz, że istnieją przesłanki świadczące o powodzeniu niniejszego projektu.

W doświadczeniu zastosowano się do zasad zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia.

Zasada ograniczenia

Z uwagi na fakt, że zmienność osobnicza w cukrzycy typu 2 jest duża (ok. 20% osobników nigdy jej nie rozwija), zaplanowano minimalną liczbę zwierząt w doświadczeniu, pozwalającą na prawidłowe przeprowadzenie analizy statystycznej uzyskanych wyników. Wykorzystanie proponowanej liczby zwierząt w cukrzycach doświadczalnych jest poparte również dostępną literaturą naukową w tym zakresie. Ponadto, tkanki pobrane w toku doświadczenia posłużą także do innych projektów naukowych, w których zostaną przeanalizowane oraz stanowić będą materiał dydaktyczny dla studentów.

W ramach zasady udoskonalenia podjęte zostaną wszelkie kroki, które radykalnie minimalizują ból, cierpienie, dystres lub trwałe urazy, jakich mogą doświadczać zwierzęta, stąd też stosowane będą odpowiednie anestetyki. Ponadto czynność *handling* pomoże zapobiec stresowi przez przyuczenie zwierząt do brania ich na ręce w trakcie wykonywania dalszych procedur, takich jak m.in. pobieranie krwi z końcówki ogona. Zapewnione zostaną zwierzętom właściwe warunki utrzymania i wzbogacenie środowiska (drewniane klocki).

Planowana jest dieta zawierająca 50% tłuszczu. Wysoka zawartość tłuszczu w diecie jest niezbędna, by u zwierząt w niniejszym modelu cukrzycy typu 2 wywołać zmiany jak najbardziej odzwierciedlające te zachodzące w chorobie u ludzi. U ludzi konsumpcja diety bogatej w tłuszcze i cukry (tzw. diety zachodniej) sprzyja powstawaniu otyłości, co prowadzi do insulinooporności i nietolerancji glukozy (tzw. stan przedcukrzycowy). Z biegiem lat nieprawidłowości te (w tym cytotoksyczność kwasów tłuszczowych) prowadzą do uszkodzenia trzustki, co skutkuje rozwojem choroby. W literaturze istnieje konsensus, iż aby poprawnie wywołać cukrzycę typu 2 w niniejszym modelu, należy u szczurów wywołać stan przedcukrzycowy (podobny jak u ludzi) i następnie w pewnym stopniu uszkodzić trzustkę niewielkimi dawkami streptozotocyny, by odzwierciedlić uszkodzenie trzustki występujące u ludzi w późnym stadium cukrzycy typu 2. W wypadku, gdy zawartość tłuszczu w diecie byłaby niższa, nie udało by się wywołać u zwierząt stanu przedcukrzycowego (łącznie z otyłością), zaś po iniekcji streptozotocyny rozwinęłaby się cukrzyca typu 1.

Proponowane w doświadczeniu mikropompy osmotyczne pozwalają na kontrolowane podawanie hormonu (przez okres 14 dni) bez konieczności powtarzania iniekcji, co wiązałoby się z dodatkowym dystresem dla zwierząt. Podawanie hormonów tą drogą jest metodą mało inwazyjną, nowoczesną i bezpieczną, a także łatwo kontrolowalną. Rekonwalescencja po tego typu zabiegu jest szybka, zaś sam zabieg obarczony jest minimalnym ryzykiem komplikacji. Ponadto, środki do anestezji zostaną odpowiednio dobrane, tak by zwierzęta nie przebudziły się w trakcie zabiegu.

Zabieg perfuzji gwarantuje dobre utrwalenie tkanek i narządów, zwłaszcza mózgow, co trudno byłoby osiągnąć poprzez zanurzenie pobranego organu w formalinie (z uwagi na jego wielkość oraz fakt, że tkanka mózgowa bardzo szybko degradowa). Wnioskodawca wraz z zespołem posiadają doświadczenie

w tego typu zabiegach. Dawki anestetyków są dobrane w taki sposób, że dotychczas nie zdarzyło się, by w czasie perfuzji któreś ze zwierząt się przebudziło.

Iniekcji dootrzewnowych nie da się zastąpić, gdyż taka jest preferowana droga podania streptozotocyny, jednakże wnioskodawca wraz z zespołem dołoży wszelkich starań, by jak najskuteczniej zmniejszyć dystres odczuwany przez zwierzęta. Do zastrzyków zostaną zastosowane najcieńsze możliwe igły (tzw. insulinówki), co pozwoli na zmniejszenie dystresu.

Pobieranie wymazów z pochwy jest standardową metodą określania fazy cyklu płciowego u szczurzy. Metoda pobierania przy użyciu pipety pasteurówki jest jednorazowa, krótkotrwała oraz bezpieczna dla zwierzęcia. Z doświadczenia zespołu oraz informacji zawartych w literaturze wynika, że metoda ta pozwala na dokładniejszą ocenę fazy cyklu płciowego (z uwagi na większą ilość pobranego materiału), przez co minimalizuje ryzyko popełnienia błędu.

Zasada zastąpienia

Dokonano analizy i wyboru dostępnych modeli eksperymentalnych pod kątem ich użyteczności w niniejszym doświadczeniu. Przy obecnym stanie wiedzy niemożliwym jest zastąpienie zwierząt w niniejszych badaniach innymi, alternatywnymi metodami (modelowanie *in silico*, metody *in vitro*). Proponowane badania skupiają się na interakcjach pomiędzy hormonami, których ekspresja następuje w różnych tkankach organizmu (mózg, wątroba, trzustka, tkanka tłuszczowa). W tym wypadku wybór nawet najnowocześniejszych metod *in vitro* (np. kultury organotypowe czy tzw. „organ-on-a-chip”) nie pozwoli na uzyskanie modelu, w którym udałoby się zbadać wiele zależności hormonalnych. Kultura *in vitro* złożona z dwóch – trzech typów komórek nie odzwierciedla interakcji zachodzących w całym żywym organizmie na różnych poziomach (anatomicznym, hormonalnym, molekularnym), na co pozwala przeprowadzenie eksperymentu z wykorzystaniem zwierząt.

8. Projekt jest objęty oceną retrospektywną²

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

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

x NIE

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