

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu **Badanie roli białka Pkd1 w regulacji metabolizmu tkanki tłuszczowej**
2. Czas trwania projektu **5 lat**
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) **lipogeneza, PKD1, metabolizm, choroby metaboliczne**
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 oraz inne choroby metaboliczne, do których zaliczane są m.in. kacheksja nowotworowa, lipodystrofia, cukrzyca typu 2, oporność na insulinę oraz otyłość, to jedne z najczęściej występujących schorzeń na świecie. Nadmierne nagromadzenie białej tkanki tłuszczowej w trakcie rozwoju otyłości przyczynia się do występowania takich zaburzeń jak cukrzyca typu 2 czy oporność na insulinę. Z kolei niedobór tkanki tłuszczowej i podwyższone wydatkowanie energii jest charakterystyczny dla takich schorzeń jak lipodystrofia czy kacheksja nowotworowa. Badania ostatnich lat wykazały, że zaburzenia lipogenezy odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju chorób metabolicznych, jednak dokładny mechanizm odpowiadający za regulację tego procesu nie jest jeszcze poznany. Lepsze zrozumienie jakie czynniki wpływają na proces lipogenezy przyczyni się do opracowania skutecznej terapii w leczeniu i zapobieganiu chorobom metabolicznym. Wyniki uzyskane w naszej pracowni na modelach in vitro, tj. przy użyciu linii komórkowej adipocytów 3T3-L1 oraz T37I, wykazały, że kinaza białkowa d 1 (Pkd1,

ang. protein kinase d 1) odgrywa kluczową rolę w regulacji procesu lipogenezy w adipocytach. Używając modeli komórkowych wykazaliśmy, że delecja Pkd1 w komórkach tłuszczowych zwiększa wydatkowanie energii i fragmentację mitochondriów. Natomiast konstytutywna nadekspresja białka Pkd1 w komórkach 3T3-L1 zwiększa lipogenezę i akumulację lipidów w postaci triacylogliceroli [Löffler et al. 2018]. Dlatego też, w oparciu o dotychczas uzyskane przez nas wyniki, postawiliśmy hipotezę, że poprzez regulację procesu lipogenezy, kinaza Pkd1 wpływa na przyrost tkanki tłuszczowej i obniżenie wydatkowania energii. Jeżeli postawiona hipoteza zostanie potwierdzona, aktywacja kinazy Pkd1 może stać się celem nowych terapii wykorzystywanych w leczeniu takich chorób metabolicznych jak kacheksja nowotworowa czy lipodystrofia.

Głównym celem naszego projektu jest określenie komórkowych i molekularnych mechanizmów odpowiadających za regulację lipogenezy w tkance tłuszczowej, a także określenie dokładnej roli kinazy Pkd1 w tym procesie.

W celu określenia zależności pomiędzy aktywacją ścieżki sygnałowej Pkd1 a procesami metabolicznymi w tkance tłuszczowej, wykorzystane zostaną myszy transgeniczne z podwyższoną ekspresją genu kodującego Pkd1 w tkance tłuszczowej białej. Opisana powyżej modyfikacja genetyczna nie powoduje szkodliwego fenotypu u myszy, co potwierdzono w Rudolf Virchow Center for Experimental Biomedicine na Uniwersytecie w Würzburgu. W celu wywołania podwyższonej ekspresji indukowanej tamoksifenem zwierzętom przez okres 10 dni będzie podawany tamoksifen. Tak krótki czas podawania tamoksifenu nie wywołuje szkodliwych efektów ubocznych u myszy. Zwierzęta będą karmione przez okres 24 tygodni standardową dietą laboratoryjną oraz dietą wzbogaconą w tłuszcz. W trakcie trwania eksperymentu 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. Tkanka tłuszczowa biała i brunatna, wybrane mięśnie szkieletowe oraz krew będą pobierane po wcześniejszym uśmierceniu zwierząt. Planowane procedury wykorzystania zwierząt zaliczane są 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: 80 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 / obesity / lipotoxicity / cancer cachexia / lipid metabolism / lipogenesis / Pkd1/ lipid accumulation.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że brak jest danych naukowych dotyczących roli Pkd1 w regulacji lipogenezy w chorobach metabolicznych.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących proces lipogenezy 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 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. Dotychczas przeprowadziliśmy szereg doświadczeń na modelach in vitro, tj. na stabilnych liniach komórkowych adipocytów 3T3-L1 oraz T37I. Uzyskane wyniki wykazały, że kinaza Pkd1 odgrywa kluczową rolę w regulacji procesu lipolizy oraz lipogenezy w adipocytach. Wyniki naszych

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

badan in vitro zostały opublikowane [Löffler et al., 2018].

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 Pkd1 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.

Podczas trwania doświadczeń zwierzęta będą poddawane szczegółowej obserwacji. Jeżeli którakolwiek z procedur spowoduje niepokojące objawy u zwierząt, zostanie wezwany weterynarz aby zbadać myszy, a eksperyment zostanie przerwany. W takim przypadku myszy zostaną uśmiercone przez dyslokację kręgów szyjnych (przerwanie rdzenia kręgowego). Kryteria podjęcia decyzji o wcześniejszym zakończeniu doświadczenia i humanitarnym uśmierceniu myszy zostały przedstawione w tabeli poniżej.

Löffler, M. C., Mayer, A. E., Trujillo Viera, J., Loza Valdes, A., El-Merahbi, R., Ade, C. P., Karwen, T., Schmitz, W., Slotta, A., Erk, M., Janaki-Raman, S., Matesanz, N., Torres, J. L., Marcos, M., Sabio, G., Eilers, M., Schulze, A., & Sumara, G. (2018). Protein kinase D1 deletion in adipocytes enhances energy dissipation and protects against adiposity. *The EMBO Journal*, 37(22), 1–19

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.