

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu Badanie wpływu poziomu manganu i glukokortykosterydów na ekspresję genu *Zip14*
2. Czas trwania projektu 2,5 roku
3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): glukokortykosterydy, hydrokortyzon, deksametazon, ZIP14, mangan
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.

Akumulacja żelaza w wątrobie jest powszechnym problemem medycznym: leży u podstaw częstej genetycznej choroby hemochromatozy i towarzyszy wielu przewlekłym chorobom wątroby. Odkładanie się żelaza w hepatocytach prowadzi do pogorszenia ich funkcji, zwiększając ryzyko rozwoju raka wątroby. Stopień akumulacji żelaza różni się jednak pomiędzy pacjentami, czego molekularne podstawy wciąż nie są w pełni poznane. U myszy, białko ZIP14 jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za gromadzenia się nadmiaru żelaza w hepatocytach. ZIP14 jest również ‘transporterem’ manganu, ważnym dla utrzymywania jego równowagi w organizmie. Niewiele jednak wiadomo na temat mechanizmów biologicznych, które wpływają na poziom ekspresji ZIP14. W naszym projekcie badamy te mechanizmy, chcąc zidentyfikować nowe czynniki ryzyka, przyczyniające się do zaburzeń gospodarki metali. Nasze wstępne wyniki in vitro wykazały, że glukokortykosterydy – hormon stresu

kortyzol, czy stosowany klinicznie lek przeciwzapalny deksametazon -

stymulują ekspresję ZIP14 w hepatocytach, co jest potęgowane przez obecność manganu. Spodziewamy się, że fizjologicznie zjawisko to może być ważne dla zmian metabolicznych w hepatocytach pobudzanych przez glukokortykosterydy. W warunkach, gdy 'wolne' żelazo będzie obecne we krwi, zjawisko to może również wpłynąć na wzmożoną akumulacji żelaza w wątrobie. W ramach niniejszego wniosku, chcemy określić czy suplementacja myszy deksametazonem wpłynie na poziom białka ZIP14 i sprawdzić czy odpowiedź ta będzie zależna od poziomu manganu w organizmie. W oparciu o dostępną literaturę, nie spodziewamy się, aby zaproponowane procedury wywołały szkodliwe zmiany fizjologiczne u myszy czy spowodowały cierpienie poza faktem wykonania iniekcji. Nasze badania mogą natomiast wnieść zupełnie nową wiedzę, ważną klinicznie, na temat czynników wpływających na równowagę metali w wątrobie i podnoszących ryzyko akumulacji żelaza.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

96 samców, Mysz domowa (*Mus musculus*)

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy, rzetelnie sprawdziłam istniejącą wiedzę w zakresie objętym wnioskiem badawczym, wykorzystując następujące bazy danych: EBSCO; PUBMED; Google Scholar; AGRICOLA; ScienceDirect; Web of Science (JCR) Użyłam następujących słów kluczowych: glucocorticoids, hydrocortisone, dexamethasone, Zip14, manganese. Na podstawie literatury, w tym prac: • Hua C i wsp. Dexamethasone impacts zinc levels in goats by regulating zinc transportation in the colon and the metabolism in the liver. *Anim Sci J*. 2018 (Hua et al., 2018) • Sayadi A i wsp. Zip14 expression induced by lipopolysaccharides in macrophages attenuates inflammatory response. *Inflamm Res*. 2013 (Sayadi et al., 2013) • Han Y i wsp. Remodeling of Zn²⁺ homeostasis upon differentiation of mammary epithelial cells. *Metallomics*. 2020 (Han et al., 2020) • Morais JBS i wsp. Association Between Cortisol, Insulin Resistance and Zinc in Obesity: a Mini-Review. *Biol Trace Elem Res*. 2019 (Morais et al., 2019) • Felber DM i wsp. Regulation of the Metal Transporters ZIP14 and ZnT10 by Manganese Intake in Mice. *Nutrients*. 2019 (Felber et al., 2019) • Thompson KJ i wsp. Manganese

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

transport and toxicity in polarized WIF-B hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018 (Thompson et al., 2018) i bazując na wieloletnim doświadczaniu z mojego obszaru badań, stwierdzam, co następuje:

Wykazany został stymulujący wpływ glukokortykosterydów na poziom białka ZIP14 w innych typach komórek, głównie hodowanych *in vitro*. Podobnie, dane literaturowe donoszą, że poziom ZIP14 może być modulowany przez obecność manganu (choć wyniki opublikowanych prac są sprzeczne). Żadna z prac nie pokazuje jednak kompleksowo znaczenia fizjologicznego czy patofizjologicznego tych regulacji. Dotychczasowe i przyszłe badania prowadzone w naszym laboratorium i łączące modele *in vitro* i *in vivo*, dotyczą synergistycznego wpływu glukokortykosterydów i manganu na poziom ekspresji ZIP14 oraz konsekwencji takiej regulacji dla funkcje wątroby. Badania tego typu nie zostały opublikowane i mają charakter nowatorski. Zasada zastąpienia Nasze obszerne badania *in vitro* z wykorzystaniem specjalistycznych linii komórkowych, a następnie z wykorzystaniem modelu mysich hepatocytów, pokazały, że poziom ekspresji ZIP14 jest stymulowany przez deksametazon. Zaobserwowaliśmy również, że efekt ten jest wzmocniony przez obecność rosnących stężeń manganu i tak samo może być wywołany przez endogenne hormon stresu: hydrokortyzon. Co ciekawe, synergistyczne działanie pomiędzy glukokortykosterydami, a manganem są specyficzne dla tego pierwiastka i nie zostały zaobserwowane w obecności jonów innych metali. Niemniej jednak, aby udowodnić znaczenie zaobserwowanego przez nas fenomenu w warunkach fizjologicznych (zaproponowane we wniosku procedury) i patofizjologicznych (w przyszłości, w kontekście chorób związanych z akumulacją żelaza w wątrobie takich jak hemochromatoza), niezbędne jest wykorzystanie modelu *in vivo*. Równocześnie, nadal będziemy prowadzić badania *in vitro*, aby szczegółowo zrozumieć, jakie mechanizmy komórkowe odpowiadają za synergistyczny efekt działania glukokortykosterydów i manganu na poziom ekspresji ZIP14. Zasada ograniczenia

Planowane badania uwzględniają ich wykonanie na najmniejszej możliwej liczbie zwierząt w poszczególnych grupach. W Procedurze I zaproponowaliśmy doświadczenia pilotażowe, aby zoptymalizować procedury i otrzymać znaczące statystycznie wyniki w eksperymentach właściwych. W doświadczeniach właściwych, użyliśmy programu Power and Sample Size Calculator oraz wiedzy z artykułów naukowych, aby jak najdokładniej oszacować liczebności grup doświadczalnych. Na podstawie testów statystycznych stwierdzamy, że zaproponowane ilości zwierząt są minimalne do otrzymania ważnych z medycznego i naukowego punktu widzenia wyników. Zasada udoskonalenia

Proponowane doświadczenia zostały gruntownie przemyślane i opracowane bazując na doświadczeniu naszego zespołu oraz fachowej literaturze. Procedury w przedstawionym projekcie zostały zaplanowane tak, aby ograniczyć do minimum stres oraz dyskomfort zwierząt. Po rzetelnej analizie literatury, wnioskujemy o użycie diet ze zróżnicowaną zawartością manganu jako sposobu na modulację poziomu manganu w organizmie. Bazując na opublikowanych danych, takie podejście jest bardzo efektywne, a nie spowoduje u myszy żadnego dyskomfortu, w odróżnieniu np. od podawania manganu za pomocą sondy drogą doustną, który również spotykany jest w artykułach. Jak donosi literatura, diety te nie wywołują też zmian patofizjologicznych. Podawanie dootrzewnowe deksametazonu będzie wykonane tak, jak szeroko pokazują to opublikowane prace: za pomocą minimalnej dawki i stosując wymiar czasowy niezbędne do przeprowadzenia planowanych badań (tj. przynoszące spodziewane zmiany funkcjonalne w wątrobie, ale nie pogarszające dobrostanu zwierząt).

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.