



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA
WIELKOPOLSKIEGO
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Paweł Antoni Kołodziejski
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Fizjologii i Biochemii
Zwierząt

Stypendysta / Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”,
Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Wpływ Obesatyny na profil hormonalny i metabolizm w szczurzym i mysim modelu otyłości i cukrzycy typu 2

Efektom drastycznej zmiany trybu życia przez współczesnego człowieka jest obserwowana eskalacja problemu otyłości prowadząca do rozwoju chorób takich jak zespół metaboliczny czy cukrzyca typu 2. Światowa Organizacja Zdrowia WHO w roku 1997 oficjalnie uznała otyłość za chorobę, która sprzyja rozwojowi innych schorzeń, a także jest związana z wysoką śmiertelnością. Według raportu Polskiego Towarzystwa Patogenezy i Terapii Otyłości z roku 1998 problem ten dotyczy w naszym kraju od 15-25% kobiet i od 10-20% mężczyzn. W minionej dekadzie liczba ludzi otyłych zwiększyła się o 10-15% i ciągle wskazuje tendencje wzrostowe. W ostatnich latach nadwaga i otyłość stały się głównymi czynnikami ryzyka zachorowalności na przewlekłe choroby, do których zaliczyć należy cukrzycę typu 2. Problemy z określeniem etiologii, charakterystyką obrazu klinicznego i potencjalnymi strategiami terapii otyłości i cukrzycy typu 2 należą do najszerzej dyskutowanych i omawianych w obrębie nauk biomedycznych. Jednocześnie, charakterystyka korelacji pomiędzy insulinoopornością a otyłością i rozwojem cukrzycy typu 2 jest jednym z głównych obszarów zainteresowań. Jednym z poważniejszych wyzwań stojących przed współczesną medycyną i biologią doświadczalną jest poszukiwanie i charakterystyka mechanizmów związanych z tymi zaburzeniami. Istotną rolę w zapobieganiu możliwości ich wystąpienia może pełnić obesatyna. Wstępne wyniki badań własnych wskazują, że ma ona potencjalny wpływ na poprawę metabolizmu glukozy, regulację pobierania pokarmu oraz poprawę profilu metabolicznego w cukrzycy i otyłości. W świetle tych wyników obesatyna może być postrzegana jako potencjalny terapeutyk w tych zaburzeniach. Głównym celem pracy doktorskiej jest zdobycie wiedzy, na temat

potencjalnego wpływu obestatyiny na metabolizm lipidowo-węglowodanowy i profil hormonalny w oparciu o myszy model otyłości i cukrzycy typu 2.

Obecnie bardzo wiele hormonów, syntetyzowanych przez tkankę tłuszczową, jak również inne tkanki obwodowe a mających wpływ na jej funkcjonowanie budzi duże zainteresowanie wśród naukowców z całego świata. Jednym z nich jest obestatyina, hormon powstały na skutek obróbki potranslacyjnej ze wspólnego dla greliny i obestatyiny prekursora preprogreliny. Jest on syntetyzowany m. in. przez komórki tkanki tłuszczowej, w tkankach zaliczanych do szlaku żołądkowo- jelitowego (dwunastnica, jelito czcze, okrężnica, trzustka, jelito cienkie i grube), a ponadto w mleku i osoczu. Z dostępnej literatury wynika, iż obestatyina może mieć znaczący wpływ na rozwój tkanki tłuszczowej m.in. stymulację pobierania pokarmu, jak również wpływ na masę ciała. Jednakże doniesienia na temat jej wpływu na proces różnicowania, metabolizm i funkcje endokrynne tkanki tłuszczowej są niejasne

Hipoteza badawcza

Obestatyina wpływa na:

- i) poprawę stanu metabolicznego związanego z przemianami lipidów i węglowodanów,
- ii) profil hormonalny myszy i szczurów z eksperymentalnie indukowaną otyłością i cukrzycą typu 2

Cel badań

Celem badań jest wykazanie pozytywnego wpływu obestatyiny na:

- i) profil hormonalny
- ii) metabolizm glukozy i metabolizm lipidowy myszy i szczurów z eksperymentalnie indukowaną otyłością i cukrzycą typu 2

Metodyka:

Indukowanie otyłości.

- Samce myszy, o masie 18-20 g oraz szczurów (200-220g) przez 4 tygodnie otrzymywać będą paszę wysoko tłuszczową (HFD o zawartości tłuszczu 60%). Następnie po rozpoczęciu doświadczenia (podanie paszy HFD) w tygodniowych odstępach będzie pobierane od zwierząt około 40 µl krwi z ogona, następnie krew zostanie odwirowana w celu oddzielenia surowicy. Surowica krwi zostanie zamrożona w celu dalszych analiz (określenie stężenia obestatyiny oraz innych parametrów metabolicznych).

Indukowanie cukrzycy typu 2 (DM2)

- Myszy o masie ciała 18-20 g Samce myszy, o masie 18-20 g oraz szczurów (200-220g) przez 4 tygodnie otrzymywać będą paszę wysokotłuszczową (HFD o zawartości tłuszczu 60%). W dalszym etapie zwierzęta otrzymają STZ (35 mg/kg masy ciała) lub bufor cytrynianowy pH 4,5 w pojedynczej iniekcji dootrzewnowej. Następnie zwierzęta utrzymywane będą przez dalsze 7 dni na diecie wysokotłuszczowej (HFD). Jednocześnie

wykonana zostanie analiza próbek krwi i pomiar masy ciała (wyznaczone zostanie BMI) w dwóch punktach czasowych: bezpośrednio przed podaniem STZ oraz tydzień po iniekcji STZ.

- Oznaczone zostanie stężenie glukozy, triglicerydów, całkowitego cholesterolu (PTC) i insuliny w surowicy krwi. Zwierzęta z glikemią powyżej 300 mg/dl uznane zostaną za cukrzycowe i będą wykorzystywane jako grupa DM2. Dodatkowo w celu zweryfikowania u myszy insulinooporności wykonane zostaną testy obciążenia insuliną i glukozą.

- Po rozpoczęciu doświadczenia (podanie paszy HFD) w tygodniowych odstępach będzie pobierane od zwierząt około 40 µl krwi z ogona, następnie krew zostanie odwirowana w celu oddzielenia surowicy. Surowica krwi zostanie zamrożona w celu dalszych analiz stężenia obestatyny oraz innych parametrów metabolicznych.

Doświadczenie *in vivo* wpływ obestatyny na metabolizm węglowodanowo-lipidowy myszy i szczurów z indukowaną otyłością i cukrzycą typu 2.

Metodyka badań zakłada przeprowadzenie szeregu doświadczeń *in vivo* mających na celu charakterystykę zarówno ostrego jak i przewlekłego podawania obestatyny na rozwój otyłości, insulinooporności i cukrzycy typu 2, kondycję metaboliczną, zmiany w profilu hormonalnym oraz metabolizmie węglowodanowo-lipidowym.

Pobieranie i kolekcjonowanie tkanek.

Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zostaną zdekapitowane przy użyciu gilotyny dla małych gryzoni. Od zwierząt zostanie pobrana krew oraz tkanki (wątroba, tłuszcz okołojądrowy, tłuszcz kreskowy, tłuszcz okołonerkowy, tłuszcz podskórny, trzustka), które od razu po pobraniu zanurzone zostaną w ciekłym azocie, a następnie skolekcjonowane w ultra zamrażarce w temp. – 80oC.

Badanie profilu hormonalnego - profil hormonalny (stężenie insuliny, glukagonu, adiponektyny, GLP-1, GiP, i/lub visfatyny i rezystyny) w surowicy krwi zostanie określony z zastosowaniem gatunkowo specyficznych testów RIA (licznik promieniowania gamma 1470 WIZARD (Wallac, USA) i/lub Elisa (Mikro płytkowy czytnik wielodetekcyjny Synergy 2 (Biotek, USA) zgodnie z protokołami załączonymi przez producenta.

Metabolizm węglowodanowo- lipidowy wpływ na metabolizm węglowodanowo-lipidowy określany będzie zarówno przyżyciowo z zastosowaniem testów obciążenia glukozą oraz testu tolerancji insuliny. W surowicy krwi określone zostanie stężenie triglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu oraz glukozy.

Określenie profilu ekspresji insuliny i glukagonu w trzustkach zostanie wykonane w wykorzystaniem najnowocześniejszego sprzętu i technik badawczych. Profil ekspresji insuliny i glukagonu w trzustkach na poziomie transkryptu oraz białka zbadany zostanie za pomocą odpowiednio techniki Real Time PCR (system LightCycler® 2.0 z użyciem specyficznych starterów i sond typu TagMan i/lub systemu QuantStudio 12K Flex™ Real-

Time PCR System) oraz techniki Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał i systemu do wizualizacji i dokumentacji - VersaDoc IMAGING SYSTEM Model 1000. BIO-RAD.

Województwo wielkopolskie, jest jednym z obszarów Polski, w który w dalszym etapie uzyskane wyniki mogą posłużyć do opracowania terapii przeciw wyżej opisywanym schorzeniom takim jak: cukrzyca typu 2 czy otyłość. Na całym świecie poszukuje się obecnie obszarów regulowania metabolizmu tłuszczowo-węglowodanowego, będącego w stanie pomóc opracować skuteczne metody leczenia jaką dla przykładu może być terapia hormonalna, która posłuży do regulacji spożywania pokarmów, a dzięki czemu będzie bardzo pomocna w leczeniu schorzeń związanych zarówno z zaburzeniami łaknienia jaki i gospodarką lipidową organizmu. Wyniki uzyskane w pracy mogą posłużyć jako podstawa do opracowania nowej terapii i technologii leczenia coraz bardziej powszechnych schorzeń, o których jest mowa (cukrzyca typu 2, otyłość, zespół metaboliczny), bądź też pozwolą głębiej poznać mechanizmy regulacji pobierania pokarmu co pozwoli w większym stopniu kontrolować zmiany związane z tymi chorobami. Na terenie wielkopolski istnieje wiele firm, dla których uzyskane wyniki mogą posłużyć bądź też do próby opracowania terapii, bądź też opracowania nowych markerów genetycznych czy fizjologicznych dla łatwiejszego diagnozowania klinicznego obrazu tych chorób. Obecnie wiele firm zainteresowanych jest wpływem nowo poznanych hormonów na metabolizm, ponieważ może być to pomocne w opracowaniu terapii wspomagających leczenie cukrzycy i otyłości.