

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu „Wpływ związków wytwarzanych przez grzyby zasiedlające jelita oraz grzyby stosowane w przemyśle spożywczym na zespół metaboliczny.”

2. Czas trwania projektu 01.10.2019 – 01.10.2021

3. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów) Mykobiota, metabolity grzybów jelitowych, mikrobiota, mikroflora jelitowa, zespół metaboliczny.

4. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) A. Badania podstawowe

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.

Celem projektu jest zbadanie wpływu związków wytwarzanych przez grzyby zasiedlające jelita i spożywcze na rozwój odpowiedzi zapalnej oraz glikemię i otyłość u szczurów.

Mimo wzrostu zainteresowania wpływem mikrobioty jelitowej na organizm człowieka wciąż niewiele wiadomo o roli metabolitów grzybów w utrzymaniu homeostazy gospodarza. Grzyby symbiotyczne zasiedlające jelita oraz stosowane w przemyśle spożywczym produkują wiele substancji, takich jak wykorzystywane w tym projekcie β -1,3-glukan i 2-fenyletanol. Istnieją przesłanki pozwalające podejrzewać, że metabolity te mogą wywierać wpływ na organizm gospodarza dzięki swojej aktywności biologicznej. Niniejszy projekt obejmuje zbadanie wpływu wymienionych substancji na elementy zespołu metabolicznego, który zwiększa ryzyko śmierci z powodów sercowo-naczyniowych.

U zwierząt wyindukowane zostanie za pomocą dootrzewnowego podania lipopolisacharydu (LPS) *E.coli* zapalenie. Zbadany zostanie wpływ diety zawierającej β -1,3-glukan i 2-fenyletanol na stężenie mediatorów zapalenia (czynnik martwicy nowotworu α = TNF- α , interleukiny 6 i 1 β).

U kolejnych zwierząt wyindukowana zostanie cukrzyca typu 1 za pomocą dootrzewnowej iniekcji streptozotocyny, a następnie badany będzie wpływ diety zawierającej 2-fenyletanol na glikemię i stężenie insuliny we krwi na czczo oraz masę ciała.

Badanie pomoże ocenić rolę metabolitów grzybów (β -1,3-glukanu i 2-fenyletanolu) w regulacji przemiany materii oraz stanu zapalnego, co może mieć istotne znaczenie dla rozwoju nowych metod prewencji i leczenia chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca czy otyłość.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badanie zostanie przeprowadzone na 80 samcach szczurów szczepu WKY.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Przygotowując projekt badawczy sprawdzono istniejącą wiedzę na temat wpływu 2-fenyletanolu i β -1,3-glukanu na elementy zespołu metabolicznego u szczurów oraz u ludzi w następujących bazach danych: Google Scholar, PUBMED, Web of Science; przy użyciu następujących słów kluczowych: 2-phenylethanol, β -1,3-glucan, fungal metabolites, mycobiota, gut fungi.

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że:

Zespół metaboliczny to zespół czynników, które są ze sobą powiązane i znacząco zwiększają ryzyko śmierci z powodów sercowo-naczyniowych. Do jego składowych należą nadciśnienie tętnicze, otyłość brzuszna, hiperglikemia na czczo, a także hipertriglicydemia i obniżone stężenie HDL. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym ryzyko uszkodzenia śródbłonna naczyniowego i powstania miażdżycy, a także cukrzycy typu drugiego jest stan zapalny, często stwierdzany u pacjentów z zespołem metabolicznym. Podejrzewa się, że metabolity grzybów zasiedlających jelita i spożywanych z pokarmem podobnie jak znacznie lepiej poznane bakterie jelitowe mogą wywierać korzystny wpływ na homeostazę człowieka na przykład modyfikując profil lipidowy i glikemię, obniżając ciśnienie tętnicze krwi lub hamując reakcję zapalną.

A. Nagromadzony materiał badawczy pozwala na stwierdzenie, że:

Metabolity grzybów mogą wywierać działanie hipolipemizujące, hipoglikemizujące, przeciwzapalne a być może i hipotensyjne. Istnieją przesłanki pozwalające stwierdzić, że β -1,3-glukan będący jednym ze składników ściany komórkowej grzybów wykazuje działanie hipoglikemizujące i zmniejsza masę ciała u szczurów.

2-fenyletanol jest metabolizowany w ustroju między innymi do estru – kofeinianu 2-fenyletylu (CAPE), który jest obecnie intensywnie badany in vitro i w modelach zwierzęcych. Przeprowadzone badania sugerują, że CAPE może działać przeciwzapalnie i obniżać ciśnienie tętnicze. Pozwala to podejrzewać, że sam 2-fenyletanol również może cechować się podobną bioaktywnością.

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

B. Brak jest danych dotyczących:

Wpływu beta-1,3-glukanu na stan zapalny. Przegląd piśmiennictwa wskazuje również na to, że brak jest badań dotyczących wpływu 2-feniloetanolu na którekolwiek z elementów zespołu metabolicznego.

Uzyskanie danych z proponowanego projektu pozwoli na:

A/ Rozwinięcie teoretyczne/poznawcze istniejącej wiedzy w kierunku:

Wpływu metabolitów grzybów jelitowych i spożywczych (beta-1,3-glukanu i 2-feniloetanolu) na nasilenie stanu zapalnego oraz glikemii i otyłość (elementy zespołu metabolicznego).

B/ Zastosowanie uzyskanej wiedzy polegające na:

Rozwoju nowych możliwości terapeutycznych w zespole metabolicznym, poprzez wpływ na mechanizm działania i skład substancji produkowanych przez mykobiotę jelitową.

Replacement – Zastąpienie:

Wybrany model szczura jest modelem najlepszym dla wyżej opisanych badań. Badane zjawiska są wypadkową współdziałania wielu narządów, tkanek oraz hormonów dlatego też niemożliwe jest zastosowanie metod alternatywnych tj. hodowle komórkowe, tkankowe. Również istota samych obserwacji, jak metabolizm podawanych związków, powstawanie metabolitów wtórnych oraz działanie przeciwzapalne i hipoglikemizujące badanych substancji, wymaga badań na żywym zwierzęciu. Nie jest możliwe również zastąpienie opisanego modelu zwierzętami o niższym rozwoju ewolucyjnym ze względu na różnice: anatomiczne przewodu pokarmowego oraz fizjologiczne w reakcjach na podawane substancje, których efekty działania u innych grup organizmów niż ssaki nie mogą być w pełni odnoszone do uzyskiwanych u ludzi. Ponadto optymalna jest wielkość zwierząt i możliwość pobrania wystarczającej ilości krwi. Szczur wędrowny jest najczęściej używanym zwierzęciem laboratoryjnym w badaniach z zakresu gastroenterologii eksperymentalnej oraz w badaniach badań związanych z florą jelit oraz jej metabolitami i ich wpływem na homeostazę gospodarza, dlatego uzyskane wyniki będzie można łatwo zweryfikować, odnieść do innych badań i wyciągnąć jak najpełniejsze wnioski. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki mogą służyć dalszym badaniom klinicznym u pacjentów, u których rozwinęło się ostre zapalenie, cukrzyca lub zespół metaboliczny.

Model wywołania ostrego zapalenia poprzez dootrzewnowe podanie roztworu LPS (lipopolisacharyd bakterii *E. coli*), został opracowany na podstawie innych prac używających takiego modelu: Ramírez K., Quesada D., Fornaguera J., 2018: A protocol to perform systemic lipopolysaccharide (LPS) challenge in rats. *J. Dental sc.*, 21-1 (January-April): 53-66.

Model wywołania cukrzycy poprzez dootrzewnowe podanie streptozotocyny jest powszechnie wykorzystywany i został opracowany na podstawie innych prac: Mostafavinia A, Amini A, Ghorishi SK, Pouriran R, Bayat M. The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. *Lab Anim Res.* 2016;32(3):160–165. doi:10.5625/lar.2016.32.3.160.

Co ważne Zespół badawczy Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej WUM ma wieloletnie doświadczenie w pracy ze szczurami, co gwarantuje bezpieczeństwo dla zwierząt w czasie anestezji, zabiegów,

pobrania krwi i pomiarów glikemii i pozostałych czynności.

Reduction - Ograniczenie:

Oszacowana liczba zwierząt w grupie w obydwu częściach doświadczenia będzie wynosiła dziesięć ($n = 10$). Liczba zwierząt została określona na podstawie następujących zakładanych parametrów. Planowana liczba zwierząt w grupie została określona w ten sposób aby uzyskać moc testu 0,8 przy założeniu błędzie $\alpha = 0,05$.

Dla Procedury 1 (wpływ na stan zapalny) różnica stężenia IL-6 pomiędzy badanymi grupami 62 pg/ml, średnia dla całej populacji 270 pg/ml, wspólne odchylenie standardowe 50 pg/ml. Na podstawie wyników uzyskanych w: Biesmans, Steven et al. (2016). Systematic Analysis of the Cytokine and Anhedonia Response to Peripheral Lipopolysaccharide Administration in Rats. BioMed Research International. 2016. 1-14. 10.1155/2016/9085273.

Dla Procedury 2 (wpływ na glikemię i masę ciała) różnica stężenia glukozy we krwi pomiędzy badanymi grupami 25 mg/dl, średnia dla całej populacji 500 mg/dl, wspólne odchylenie standardowe 20 mg/dl. Na podstawie wyników: Wei, M., Ong, L., Smith, M. T., Ross, F. B., Schmid, K., Hoey, A. J., ... & Brown, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart Lung & Circulation., 2003; 12(1), 44-50.

W powyższych wyliczeniach użyto kalkulatora <http://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>.

Należy podkreślić, że wykonywane zabiegi w minimalnym stopniu stwarzają ryzyko zgonu zwierzęcia. Jeszcze większe ograniczenie liczebności grup może skutkować, w przypadku śmierci pojedynczych zwierząt, utratą istotności statystycznej w opisanych badaniach, a tym samym nieważnością uzyskanych wyników.

Refinement - Udoskonalenie:

Badane metabolity grzybów będą podawane doustnie, z pożywieniem.

Po iniekcji roztworu LPS zwierzęta będą doglądane co 2 godziny. Zwierzęta zostaną znieczulone i uśmiercone niezwłocznie po 6h od iniekcji. Jeżeli zostanie zaobserwowane oznaki bólu u zwierząt, zostaną one znieczulone wcześniej. Krew od zwierząt zostanie pobrana dopiero po upewnieniu się, że zwierzę jest w pełni znieczulone.

Szczury z wyindukowaną cukrzycą będą poddane codziennej ocenie stanu klinicznego, zwłaszcza stanu nawodnienia. Zwierzęta w czasie zabiegów będą poddane znieczuleniu ogólnemu. Zostanie zastosowana analgezja wyprzedzająca i pooperacyjna w przypadku procedur nieterminalnych.

W klatkach bytowych zwierząt zostaną umieszczone tekturowe rurki.

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.