

Przemiany cywilizacyjne, które zaszły w ostatnich kilku dekadach związane są ze wzrostem zachorowalności na różnego rodzaju zaburzenia metaboliczne skorelowane z patologiczną otyłością oraz insulinoopornością (IO), prowadząc do coraz częstszego występowania syndromu metabolicznego (MetS), a w konsekwencji cukrzycy typu II. Insulinooporność, czyli niezdolność tkanek do reakcji na insulinę, stała się poważnym problemem w skali globalnej nie tylko u ludzi, ale także w medycynie weterynaryjnej. Podobna dolegliwość występująca u koni (ang. *equine metabolic syndrome*, EMS) charakteryzuje się specyficznym otłuszczeniem, insulinoopornością, hiperleptynemią i hiperinsulinemią, lokalnym i ogólnoustrojowym stanem zapalnym oraz zachorowalnością na ochwat. Ochwat to bardzo bolesna i skrajnie wyniszczająca choroba tworzywa kopytowego, która nieleczona może doprowadzić do perforacji powierzchni kości, i w konsekwencji do eutanazji. Niestety z powodu złożonego charakteru choroby, patogenezą EMS nadal pozostaje niejasna, co znacznie ogranicza możliwości opracowania skutecznej terapii.

Nasz zespół posiada duże doświadczenie w badaniu zaburzeń metabolicznych w obrębie tkanki tłuszczowej, a także komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego (ang. *adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*, ASCs) u koni cierpiących na EMS. Jako pierwsi na świecie chcielibyśmy zbadać wpływ dysfunkcji wątroby na rozwój tej choroby. Wiadomo, że u ludzi cukrzyca typu II rozwija się wyłącznie wówczas, gdy zostanie zaburzona autoregulacja w wątrobie, co oznacza nadprodukcję glukozy. Ponadto, MetS jest ściśle związany z podwyższonym poziomem enzymów wątrobowych, takich jak transferaza γ -glutamylowa (GGT) oraz obniżonym poziomem globuliny wiążącej hormony płciowe (ang. *sex hormone binding globulin*, SHBG) we krwi. Zmiany te są ściśle skorelowane ze wzmożoną lipogenezą oraz progresją niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD). W badaniach wstępnych wykazaliśmy, że podobnie do ludzi wątroba koni z EMS charakteryzuje się IO, lipotoksycznością (akumulacją lipidów w tkankach wrażliwych na insulinę, jak wątroba oraz mięśnie szkieletowe), stresem retikulum endoplazmatycznego (RE) oraz podwyższoną ekspresją PPAR γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), natomiast obniżonym poziomem SHBG oraz adiponektyny. Niski poziom SHBG i adiponektyny oraz wysoki PPAR γ prawdopodobnie zwiększa aktywność enzymów lipogenetycznych w wątrobie. Ponadto, zaobserwowaliśmy podwyższony poziom aminotransferazy asparaginianowej (AST) i GGT we krwi koni z EMS. Podwyższona ekspresja interleukiny 6 (IL-6) oraz infiltracja komórek układu immunologicznego sugerują nasilenie stanu zapalnego. Stres RE prowadzi do aktywacji mechanizmu odpowiedzialnego za obronę komórki przed szkodliwą akumulacją niesfałdowanych białek (ang. *unfolded protein response*, UPR). Zaobserwowaliśmy podwyższoną ekspresję genów zaangażowanych w UPR, w tym IRE-1 α (ang. *inositol requiring 1 α*) oraz XBP1 (ang. *X-box binding protein*), co oznacza podwyższony stres RE. IRE-1 α jest najlepiej poznanym i jednocześnie najbardziej konserwatywnym szlakiem UPR, pełniącym istotną funkcję w ochronie przed letalnymi skutkami podwyższonego stresu RE, jednak jego nadmierna aktywność prowadzi do śmierci komórki.

Wpływ stanu fizjologicznego wątroby na rozwój EMS nie został jeszcze poznany, jednak z powodu jego ogromnego udziału w rozwoju MetS u ludzi, uważamy, iż poprawienie funkcjonowania hepatocytów u koni z EMS poprzez wyciszenie aktywności IRE-1 α może zredukować IO i jednocześnie nasilić biosyntezę SHBG. W tym celu, w ramach proponowanego projektu postanowiliśmy zbadać regulację procesu lipogenezy w wątrobie oraz sprawdzić, jak wyciszenie szlaku IRE-1 α wpłynie na biosyntezę SHBG, wrażliwość komórek wątroby na insulinę oraz ich żywotność. Projekt złożony jest z kilku głównych etapów skupionych zmianach na poziomie molekularnym, które pomogą odpowiedzieć na pytanie, czy IRE-1 α jest odpowiednim celem w leczeniu syndromu metabolicznego. Zaczniemy od szczegółowej charakterystyki tkanki wątrobowej koni z EMS. W tym celu zbadamy lipotoksyczność, morfologię RE, UPR, poziom apoptozy, lipogenezy, stanu zapalnego i ekspresję markerów IO oraz genów odpowiedzialnych za regulację biosyntezy SHBG. Do tego celu wykorzystamy następujące techniki: qRT-PCR, western blot, elektronową mikroskopię transmisyjną (TEM) oraz immunofluorescencję (IF). Następnym krokiem będzie wyciszenie (knockout) genu IRE-1 α w hepatocytach wyizolowanych od koni z EMS lub linii hepatocytarnej HepG2 (Hep^{IRE-1 α /null}) metodą CRISPR/Cas9. Aby sprawdzić, jak wyciszenie IRE-1 α wpłynie na biosyntezę SHBG, ekspresję enzymów zaangażowanych w lipogenezę i żywotność komórek zostanie zainicjowana IO poprzez lipotoksyczność z użyciem palmitynianu sodu. Szczegółowe badania zostaną wykonane z użyciem qRT-PCR, IF, TEM, western blot oraz systemu opartego na cytometrii przepływowej. Kolejnym etapem będzie indukcja polaryzacji makrofagów (RAW 264.7) za pomocą palmitynianu. Następnie, aktywowane makrofagi zostaną wykorzystane do ko-hodowli z Hep^{IRE-1 α /null}, po czym przeanalizujemy typ polaryzacji makrofagów na podstawie ich fenotypu oraz profilu wydzielanych cytokin, a także ich wpływ na biosyntezę SHBG, IO, stres RE, apoptozę oraz lipogenezę w komórkach Hep^{IRE-1 α /null}.

Realizacja projektu pozwoli na znaczne poszerzenie wiedzy w zakresie endokrynologii u ludzi oraz zwierząt. Ponadto, umożliwi dostarczenie niezwykle cennych informacji pozwalających na głębsze zrozumienie zmian molekularnych zachodzących w wątrobie podczas rozwoju syndromu metabolicznego.