

OBRAZAC 3

Naslov projekta	<i>Mehanizmi prirodne imunosti u razvoju upale visceralnog masnog tkiva i rezistencije na inzulin u debljini</i>		
Trajanje projekta	31.7.2016.-31.12.2017.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Šećerna bolest tipa II, inzulinska rezistencija, upala visceralnog masnog tkiva		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	<i>Epidemija debljine predstavlja svjetski zdravstveni problem koji ima svoje značajne ekonomske i socijalne posljedice. Procjenjuje se da danas ima oko pola milijarde debelih osoba u svijetu (eng. body mass index – BMI >30) te preko milijarde s prekomjernom težinom (BMI 25-30). Najčešće posljedice debljine su metabolički poremećaji poput rezistencije na inzulin perifernih tkiva koja često progredira u šećernu bolest tipa 2 sa brojnim komplikacijama. Danas postoji opći konsenzus da je aktivacija imunološkog sustava u visceralnom adipoznom tkivu (VAT) u debljini izvor razvoja sistemske kronične upale niskog intenziteta. Ona pak predstavlja glavnu podlogu za razvoj rezistencije na inzulin. Istraživanja provedena u posljednjih nekoliko godina, uglavnom na animalnim modelima, pokazuju da dominantnu populaciju čine makrofazi. U mršavih ljudi ili životinja hranjenih normokalorijskom dijetom (5-6% masti, eng. NCD) ove stanice imaju fenotip antiupalnih M2 makrofaga koji izlučuju Th2 citokine poput IL-4 i IL-13 te u interakciji sa drugim stanicama (eozinofili, mastociti, NKT stanice, Treg stanice i ILC2 stanice) sprječavaju diferencijaciju i privlačenje proupalnih stanica iz cirkulacije. No u slučaju upotrebe visokokalorijske dijeta (50-60% masti, eng. HFD) dolazi do pretvorbe M2 u M1 makrofage koji izlučuju proupalne citokine poput TNF-α, IL-1β, IL-5 i dr. To ima značajne učinke na diferencijaciju i proliferaciju stanica u samom visceralnom adipoznom tkivu, ali i na privlačenje drugih proupalnih stanica iz cirkulacije u masno tkivo. Proupalni citokini djeluju sistemski poticanjem upalnog signaliranja i ometanjem signaliranja putem inzulinskog receptora.</i> <i>Unatoč brojnim studijama koje su učinjene u ovom području, još uvijek nisu posve jasni mehanizmi inicijalne</i>		

	aktivacije imunološkog sustava, niti je poznato koje sve stanice imunološkog sustava sudjeluju u tom procesu. Naša je hipoteza da neke od stanica i receptora prirodene imunosti (ILC1, ILC3, $\gamma\delta$ limfociti T i B1 limfociti, NKG2D, NCR1, $\gamma\delta$ TCR), koje su prisutne u VAT-u, imaju važnu ulogu u translaciji metaboličkog stresa adipocita masnog tkiva u upalnoj reakciji. Ova hipoteza bazirana je na dosadašnjim spoznajama: 1. visceralno adipozno tkivo miševa na normalnoj dijeti ima osobit sastav imunoloških stanica u kojem dominiraju makrofazi, ILC stanice, $\gamma\delta$ limfociti T, a manje su prisutni limfociti adaptivne imunosti; 2. vrlo rano nakon tretmana s HFD dolazi do porasta broja ILC1 i makrofaga, a značajno se povećava i izlučivanje interferon gamma (IFNγ); 3. makrofazi u VAT-u proliferiraju i konventiraju se u proupalne M1 makrofage već vrlo rano na početku HFD; 4. deplecija IFNγ dovodi do prevencije konverzije makrofaga; 5. eksperimenti na miševima sa teškom kombiniranom imunodeficijencijom (SCID) i bez adaptivne imunosti pokazuju da su oni sposobni razviti inzulinsku rezistenciju; 6. Klrk1 k.o. (NKG2D deficitni miševi) razvijaju inzulinsku rezistenciju puno prije kontrole; 7. udio $\gamma\delta$ limfociti T je neobično visok u VAT-u (5-6%); 8. uočava se prisutnost ILC1 stanica u VAT-a. Glavni cilj istraživanja u ovom projektu jest istražiti uloge pojedinih stanica i receptora stanične imunosti (stanica senzora) kao što su ILC1, ILC3, $\gamma\delta$ limfociti, limfociti T i B1 limfociti, NKG2D, NCR1, $\gamma\delta$ TCR receptora u translaciji metaboličkih stresa masnih stanica u VAT-u u aktivaciji imunološkog sustava i razvoja upale. Specifični ciljevi istraživanja bili bi: 1. istražiti koje se stanice prirodene imunosti aktiviraju u VAT-u unutar prva 2 tjedna od početka tretmana sa HFD, utvrditi dinamiku aktivacije i citokine koje izlučuju; 2. istražiti zašto hiperreaktivne stanice NK u Klrk1 k.o. miševa dovode do bržeg ravoja inzulinske rezistencije i na koji način; 3. istražiti ulogu $\gamma\delta$ limfocita T, mehanizme njihove aktivacije; 4. istražiti ulogu pojedinih subpopulacija prirodnih limfocita (ILC), posebno ILC1 i ILC3 u razvoju upale VAT-a; 5. istražiti koje su molekule važne za aktivaciju imunološkog sustava a da su izražene u hipertrofiranim adipocitima.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Debljina, i njezina glavna klinička komplikacija, šećerna bolest tipa II, koja postaje nova globalna epidemija, ima snažan negativan učinak na duljinu i kvalitetu života. Visoka cijena dijabetesa ogleda se u mortalitetu, koji je uzrokovan komplikacijama dijabetesa, rastućim troškovima javno zdravstvenog sustava i gubitku radne snage s obzirom da je populacija koju dijabetes pogađa sve mlađa. U navedenom projektu želimo ustvrditi inicijalne mehanizme koji sudjeluju u mehanizmu nastanka upale VAT-a koja dovodi do razvoja inzulinske i glukoze rezistencije i posljedično DM2. Otkriće navedenih mehanizama otvorilo bih nove spoznaje u

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	<i>načinu sprječavanja razvoja DM2 sa posljedičnom translatacijom u humanu medicinu.</i>
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	<i>U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom 17 mjeseci je 1020.</i>
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	<i>Životinje će u pokusima biti podijeljene na dvije grupe. Prvu grupu činiti će životinje na normokalorijskoj dijeti (NCD) koje će predstavljati pokusne kontrole. Drugu skupinu životinja činiti će životinje na viskokalorijskoj dijeti (HFD) u kojima će se gledati razvoj inzulinske i glukozne netolerencije u različito vrijeme nakon uspostave posebne prehrane. U određenom vremenskom periodu nakon početka HFD dijet provoditi će se test tolerancije na glukozu ili test na inzulinsku rezistenciju, a po završetku pokusa životinje će biti usmrćene, a njihovi organi/stanice analizirani. Budući da je u literaturu opisano da se komplikacije DM2 kod miševa javljaju tek nakon 14 tjedna ne očekujemo da će životinje osjećati patnju ili bol. Ukoliko primjetimo da životinje osjećaju patnju ili bol biti će usmrćeni na human način. U navedenom istraživanju očekujemo razinu težine postupaka koja je BLAGA.</i>
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	<i>Životinje će se koristiti s obzirom da ne postoji alternativna metoda za istraživanje inicijalnih mehanizama u upali visceralnog adipoznog tkiva u nastanku šećerne bolesti tipa II. Budući da u upali visceralnog adipoznog tkiva i nastanku šećerne bolesti sudjeluje više organskih sustava ne postoje metode/protokoli koji bi laboratorijske životinje zamijenili modelom staničnih kultura. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća. Zbog navedenog, razvijen je mišji model dijetom inducirane debljine i razvoja šećerne bolesti tipa 2.</i>
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	<i>Broj životinja koji će se koristiti u pokusima izračunat je testovima za određivanje veličine uzorka u istraživanju koji su dostupni na internetu http://www.danielsoper.com/statcalc/calculator.aspx?d=47. U navedenom programu za izračunavanje veličine uzorka potrebni su sljedeći podaci: snaga testa (uobičajna snaga testa u biomedicinskim istraživanjima iznosi 80%), razina značajnosti (uobičajna razina značajnosti u biomedicinskim istraživanjima iznosi 0,05%) te veličina učinka koja je izračunata iz Cohen-ove formule za izračunavanje iste. Prema navedenom u našim istraživanjima koristimo 5 životinja po grupi, što je najmanji mogući broj životinja koje možemo koristiti u grupi za dobivanje statistički značajnih rezultata ukoliko isti postoje.</i>
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	<i>S obzirom da su kronična sistemska upala i šećerna bolest tipa 2 složene bolesti u kojima sudjeluje više organskih sustava, nemoguće je iste istraživati na staničnim kulturama in vitro. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća. Zbog navedenog, razvijen je mišji model dijetom inducirane debljine i razvoja šećerne bolesti tipa 2. Miševi soja C57BL/6J se uobičajeno koriste u</i>

	<i>mišjem modelu debljine (i šećerne bolesti tipa 2) zbog određenih predispozicija i povećane osjetljivosti u odnosu na druge miše sojeve. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga. Životinjama će tijekom svih eksperimenata biti praćeni znakovi nelagode ili stresa te će u slučaju istih životinje biti usmrćene na human način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo BLAGU nelagodu te će biti usmrćene ako problemi sa zdravljem ili dobrobiti prerastu tu razinu. Tijekom pokusa životinje će biti smještene u grupama u individualno ventiliranim kavezima (engl. Individually ventilated cages, IVC). Na kraju pokusa životinje će biti eutanazirane na human način. Također svim životinjama u pokusu obogaćivati će se kavezi skloništima i materijalima za pravljenje gnijezda.</i>
--	---