

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Funkcija novo-otkrivenog proteina u mozgu, urogvanilina, od stanične fiziologije do ljudskog zdravlja		
Trajanje projekta	1.1.2019.-31.12.2022.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Urogvanilin, hipotalamus, metabolizam, ljudi		
	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).	Diabetes mellitus tipa 2 (T2DM) i komplikacije koje uzrokuje ova bolest veliki su teret za današnje čovječanstvo. Samo u Europi je danas oko 60 milijuna dijabetičara i samo troškovi liječenja godišnje prelaze 130 milijardi eura. Komplikacije ove bolesti koje nastaju zbog povišene razine glukoze u krvi (hiperglikemija) godišnje uzrokuju smrt oko 3,4 milijuna ljudi u svijetu (podaci Svjetske Zdravstvene Organizacije). Da bi održali homeostazu glukoze kod oboljelih od T2DM i spriječili ili odgodili dijabetičke komplikacije koriste se različiti pristupi, ali samo s ograničenim učinkom (smanjenje stvaranja glukoze, smanjena apsorpcija glukoze iz crijeva regulirana prehranom ili povećano iskorištavanje glukoze tjelovježbom ili terapijom inzulinom). Novi pristup ovom problemu bio bi porast potrošnje glukoze putem aktivacije smeđeg masnog tkiva (eng: brown adipose tissue, BAT) mehanizmima regulacije putem središnjeg živčanog sustava. BAT ima ulogu peći u našem tijelu koja pretvara glukozu nakon obroka u toplinu u sklopu termogeneze uzrokovane hranom. Funkcija BAT-a propada sa starošću i povećanjem tjelesne težine. Mehanizam aktivacije BAT-a nakon obroka još uvijek nije dovoljno razjašnjen. Nedavno smo otkrili novi protein u mozgu, urogvanilin (UGN), čiji izražaj se mijenja nakon unosa hrane te promjene u njegovoj funkciji u mozgu kod laboratorijskih životinja u odgovarajućoj mjeri prati promjena aktivnosti BAT-a. Cilj ovog projekta je odrediti funkciju UGN-a u mozgu i njegovu ulogu u fiziologiji BAT-a. To će biti istraženo na staničnoj razini (elektrofiziološka istraživanja), na životinjskom modelu (miševi) te će na kraju važnost uloge UGN-a biti određena na zdravoj i dijabetičkoj populaciji. Specifični ciljevi ovog projekta su odrediti: mehanizam djelovanja UGN-a u hipotalamusu, regulacija stvaranja UGN-a u mozgu, posljedične promjene u metabolizmu glukoze te promjene volumena i aktivnosti BAT-a nakon produljene primjene UGN-a. Usporedit ćemo ulogu UGN-a u regulaciji aktivnosti BAT-a kod oboljelih od T2DM i zdravih ispitanika mjerenjem aktivnosti BAT-a nakon obroka. Ta aktivnost biti će uspoređena s promjenama u homeostazi glukoze i sintezom inzulina, glukagonu sličnog peptida-1 (eng: glucagon - like peptide -1, GLP-1) i UGN-a. Moguće utjecaj dobi, spola i tjelesne težine na moždane učinke UGN-a biti će određeni procjenom izražaja njegovog receptora, gvanilat ciklaze C (GC-C), u različitim regijama ljudskog mozga. Aktivnost BAT-a nakon obroka biti će određena jednostavnom, neinvazivnom, ali dovoljno osjetljivom infracrvenom termografijom, umjesto uobičajene pozitronske emisijske tomografije - kompjutorizirane tomografije (PET-CT) koja izlaže pacijenta radioaktivnosti. Svi pokusi biti će izvedeni na oba spola zbog toga što postoje velike razlike u metabolizmu glukoze između muškaraca i žena koje još nisu u potpunosti razjašnjene.		

I. Osnovne odjopne vrijede
Upravljanje vjerojatnošću i sigurnost hrane

Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Ovaj projekt potaknut će nova istraživanja metaboličkih poremećaja u oba spola. Ovo istraživanje moglo bi dovesti do novog pristupa liječenju hiperglikemije kod oboljelih od T2DM koje bi poboljšalo metabolizam glukoze, smanjilo komplikacije dijabetesa, odgodilo terapiju inzulinom, smanjilo troškove liječenja te sveukupno unaprijedilo kvalitetu života oboljelih od T2DM.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U ovom projektu bit će korišteni mužjaci i ženke divljeg tipa linije C57Bl/6NCrl (WT), UGN KO (donacija prof. Dr. AP Naren, Cincinnati, OH, SAD) i GC-C fluorescentna mišja linija (GFP-GC-C) (Applied StemCell, Inc., CA, SAD). Tijekom 4 godine projekta predviđa se potreba za 506 životinje.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Kako do realizacija ciljeva ovog projekta nije moguća drugim modelima istraživanja, u ovom projektu ćemo koristiti minimalan broj laboratorijskih životinja u pokusima koji će se provoditi prema načelima dobre laboratorijske prakse, te u skladu sa preporukama iz relevantne literature. Sve pokusne zahvate na životinjama smo temeljito tehnički i metodološki proučili, pripremili i prilagodili, tako da su maksimalno usmjereni na smanjivanje patnje životinja tijekom pokusa kao što detaljnije slijedi: U ovom projektu životinje će biti anestetizirane ketaminom/xilazinom (80-100 mg/kg, 10-12,5 mg/kg i.p.) (IACUC Guidelines: Anaesthesia) osim ako nije navedeno drugačije. Svi pokusi na laboratorijskim životinjama bit će izvođeni pod nadzorom Jadranke Bubić, službenog veterinara Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Intracerebroventrikularna (icv) i intraperitonealna aplikacija (ip): Mužjacima i ženkama miševa divljeg tipa starijima od 5 mjeseci bit će obrijana interskapularna regija te će gladovati preko noći. Anestezija će biti inducirana sa smjesom 70/30% N₂/O₂ koja sadrži 4% izoflurana (Forane), a zatim održavana tijekom pokusa naredna 2 sata. Za icv aplikaciju životinja će biti postavljena u aparat za stereotaksiju. Incizija na koži glave biti će napravljena od vrata do između očiju i Bregma će biti vizualizirana. Hamilton igla sa špricom će se ući u područje desnog lateralnog ventrikla. 1 µl otopine bit će apliciran brzinom 0,5 µl/min. Igla će biti izvađena, koža zašivena i životinja postavljena na grijaču podlogu za oporavak. Životinje će biti održavane u anesteziji tijekom cijelog eksperimenta nakon čega će biti dekapitirane. Isti postupak će biti ponovljen davanjem i.p. otopine UGN-a. Za implantaciju icv kanila životinje će biti anestetizirane ketaminom/xilazinom (80-100 mg/kg, 10-12,5 mg/kg i.p.) te će se kanila postaviti lateralnu komoru koje će potom biti spojene na Alzet osmotske minipumpe smještene potkožno kojima će se aplicirati inzulin, GLP-1 ili otapalo. Miševi će biti smješteni na grijaču podlogu do oporavka. Infračvena termografija: Aktivnost interskapularnog masnog tkiva kod životinja bit će mjerena nakon gladovanja preko noći te 30 min, 1 i 2 sata nakon obroka sata nakon obroka ili icv i ip primjene UGN-a korištenjem termalne kamere (FLIR T-650sc, FLIR Systems, Wilsonville, OR, SAD). Aktivnost smeđeg masnog tkiva bit će prezentirana kao otpuštena energija. Rezultati će biti uspoređeni s rutinskim parametrima kao što su: koncentracije glukoze natašte, 30 min, 1 i 2 h nakon obroka (Contour Next, Ascensia Diabetes Care Holdings AG, Basel, Švicarska). Elektrofiziološki pokusi: Kako bismo odredili učinak UGN na neurone u hipotalamusu koji izražavaju GC-C, provest ćemo seriju elektrofizioloških pokusa na moždanim rezovima mjesec dana starih mužjaka i ženki GFP-GC-C miševa. Nakon anestezije ketaminom/xilazinom, miševi će biti transkardijalno perfundirani ledeno hladnim, oksigeniranim umjetnim likvorom. Životinje će biti dekapitirane te će mozak biti izoliran za elektrofiziološka istraživanja. MRI: Za određivanje volumena iBAT-a koristit ćemo MRI koji se nalazi u multimodalnom centru za oslikavanje GlowLab Laboratorij za regenerativnu neuroznanost, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet,

	Hrvatska (FP7: GlowBrain). Maskirani istraživač neće biti upoznat sa grupom kojoj pripada pojedina životinja koja će biti skenirana. Anestezija će biti inducirana sa smjesom 70/30% N₂/O₂ koja sadrži 4% izoflurana (Forane), a zatim održavana tijekom skeniranja. Temperatura tijela životinja će se pratiti i održavati na 36,8-37,2 °C. Sva MRI snimanja izvodit će se na 7T MR sustavu za male životinje (BioSpec 70/20 USR, Bruker Biospin) i provoditi pomoću ParaVisiona (Bruker Biospin). Nakon oporavka od anestezije životinje će biti premještene u vivarij radi daljnjih istraživanja. RNAscope: Koristit ćemo RNAscope (ACD, Bio Techne) koji omogućava kombiniranje moderne RNA in situ hibridizacije i imunohistokemije za određivanje kolokalizacije mRNA UGN i inzulinskog ili GLP-1 receptora. Miševi će biti anestezirani ketaminom/xilazinom i transkardijalno perfundirani fosfatnim puferom (PBS) i 4% PFA. Nakon dekapitacije mozak će biti izoliran i naknadno fiksiran u istom fiksativu preko noći. Real-time (q)PCR: Nakon cervikalne dislokacije bit će izvađen mozak, abdominalno bijelo i interskapularno smeđe masno tkivo. RNA će biti izolirana Trizolom (Sigma), reverzno prepisana u cDNA koja će biti analizirana kvantitativnim real-time PCR –om (ABI Prism 7500, Applied Biosystems).
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Tijekom ovog projekta životinje će se koristiti za otkivanje uloge UGN-a u mozgu, povezanost s nastankom šećerne bolesti tipa 2 i razvoj nove terapije ove bolesti. Kako je za dobrobit pacijenata ovo istraživanje neizmjereno važno, a zbog kompleksnosti tematike ovo istraživanje jedino možemo provesti na mozgovima sisavaca. Tijekom izvođenja pokusa posebice će se voditi briga o dobrobiti pokusnih životinja od upotrebe odgovarajućih anestetika do izvođenja pokusa gladovanja.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Upravo da bi se smanjio broj životinja svi eksperimenti su parni. Tijekom parnih pokusa smanjen je broj životinja potreban po grupi da bi se zamijetio istraživani učinak. Nadalje, izvođenjem različitih istraživanja na istoj životinji (kao npr procjena unosa hrane, koncentracija glukoze u krvi prije i nakon obroka, promjena aktivnosti iBAT-a) omogućava nam postavljanje korelacija koje bi dovele do razvoja novog terapijskog pristupa u liječenju šećerne bolesti tipa 2.
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.	GC-C fluorescentna mišja linija (GFP-GC-C) koja će biti generirana sredstvima ovog projekta je od neizmjerne važnosti i za ovo i za buduća istraživanja. Točno određivanje neurona koji posjeduju GC-C dramatično smanjuje broj potrebnih životinja za elektrofiziološka istraživanja. UGN KO životinje posjeduju poremećaj u metabolizmu glukoze (hiperglikemija 30 min i 2 sata nakon obroka) koju upravo želimo istražiti te proučiti da li će centralna djelovanje UGN-a smanjiti ovaj poremećaj jednako u ženki i mužjaka UGN KO životinja. Tijekom cijelog projekta iznimno će se voditi briga o anesteziji i ispravnom usmrćivanju životinja. Tijekom anestezije životinje će biti smještene na grijaćoj podlozi zbog održavanja tjelesne temperature. Nakon operativnog zahvata ugradnji icv pumpi, životinje će primati adekvatnu analgeziju. U ovom istraživanju uvodimo novu neinvazivnu metodu mjerenja aktivnosti smeđeg masnog tkiva termalnom kamerom. Do sada se koristio PET-CT tijekom kojeg se životinji daje radioaktivna glukoza te je tijekom cijelog postupka snimanja u anesteziji. Uvođenjem nove metode se uvelike smanjuje stres te su s time i rezultati vjerodostojniji.

