***P9-Bacillus coagulans* probiotiko edo postbiotikoaren administrazioak bideratutako efektuen konparaketa dieta bidez eragindako obesitatearen eta intsulinarekiko erresistentziaren prebentzioan. Zelulaz kanpoko besikulen inplikazioa osagai efektore gisa,**

Obesitatea hainbat faktorek eragindako gaixotasun konplexua da, zeinaren prebalentzia altuak lehen mailako osasun-arazo bihurtzen baitu. Gaixotasun honek maila-baxuko hantura egoera kronikoa eragiten du, eta honek, berriz, gantz-ehunaren disfuntzioa eta intsulinarekiko erresistentzia/2 motako diabetesa eragin ditzake. Azken urteetan arreta berezia jarri zaio hesteko mikrobiotaren disbiosiari obesitatearen faktore etiologiko gisa. Testuinguru honetan, eta kontuan izanik obesitatearen tratamendu ez-farmakologiko konbentzionalak (dieta hipokalorikoak eta jarduera fisikoaren sustapena) lortu ohi duen jarraipen eskasa, proposatu da obesitatea tratatzea bakterio probiotikoak hartuz, zeinak hesteko mikrobiotan zuzenean eragingo duten. *Bacillus coagulans* (*B. coagulans*) bakterioak eraginkortasuna frogatu du zenbait asaldura metabolikoren maneiurako bai ikerlan prekliniko zein entsegu klinikoetan. Bestalde, eta kontuan izanik bakterio biziak hartzeak badituela bere arriskuak, berriki komunitate zientifikoa postbiotikoetan zentratu da; bakterio probiotikoen inaktibaziotik eratorritako zelula mikrobiano ez-bideragarriak. Era berean, probiotikoen hainbat osagai ere identifikatu dira zeinak bakterio osoen kontsumoak eragindako onuren arduraduntzat jotzen diren. Horien artean zelulaz kanpoko besikula (ZKB) bakterioak nabarmentzen dira, zeinak odol-zirkulaziora heltzeko gaitasuna duten, ostalariaren ehunetara iritsiz.

Helburu nagusia

B. coagulans-ak dieta bidez eragindako obesitatea eta intsulinarekiko erresistentzia prebenitzeko gaitasuna mantentzen duen aztertzea bero bidez inaktibatu ondoren administratzen denean, eta zehaztea ea bakterio horrek ekoiztutako ZKB-ak eragin horren erantzuleak diren.

Metodologia

Proiektu hau dieta bidez eragindako obesitatea eta intsulinarekiko erresistentzia duen animalia-modelo prekliniko batean oinarritzen da. Dimorfismo sexual posiblea aztertu ahal izateko, diseinu bereko bi ikerlan egingo dira. 8 asteko Wistar arratoiak erabiliko dira eta bost talde esperimentaletan banatuko dira (sexu bakoitzeko): kontrol osasuntsu taldea dieta komertzial estandar batekin elikatuko da eta gainontzeko lau taldeak, berriz, gantzean eta fruktosan aberatsa den dieta komertzial batekin (energiaren %40 eta %10, hurrenez hurren) elikatuko dira obesitatea, intsulinarekiko erresistentzia eta gibel-gantzatsua dituen modelo bat lortzeko. Azken arratoi hauen talde batek dieta bakarrik jasoko du (kontrol obeso taldea), beste talde batek dietaz gain *B. coagulans* bizia jasoko du (1×10^9 UKF/egun), beste talde batek *B. coagulans* bero bidez inaktibatutako *B. coagulans* (1×10^9 UKF/egun) eta azken taldeak *B. coagulans*-etik eratorritako ZKB-ak (*B. coagulans*-en 1×10^9 UKF dosi batek ekoiztuko lukeen ZKB kopurua). Tratamenduak egunero emango dira aho bidez (pipetaz) sakarosadun ura (%5-era) erabiliaz ibilgailu bezala. Tratamendurik jasoko ez duten animaliei ibilgailua bakarrik emango zaie. Baldintza esperimental hauek 8 astez mantenduko dira, eta, ondoren, animaliak hil egingo dira gantz-ehun biltegi ezberdinak (zuria eta arrea), muskulu eskeletikoa, odola, hesteko mukosa eta gorotzak (mikrobiota eta metabolitoen analisia) biltzeko.
Proposatutako diseinu esperimentalak ***egunero animaliekin lan egitea*** *suposatzen du (esperimentazio animalien zaintza eta prozedimenduak egitea astelehenetik igandera) UPV/EHU-ko Farmazia Fakultateko abeltegian.*

Egin beharreko neurketak

Esperimentuak iraungo dituen 8 asteetan animalien pisua eta hauek jandako dieta kopurua neurtuko dira egunero (esperimentua egokiro betetzen doala ziurtatzeko edo/eta *pair fed* talde bat behar den jakiteko).

Animaliei eutanasia egitean organo eta ehun ezberdinen pisuak gordeko dira (nagusiki gibela eta gantz-ehun zuri eta arrea) zehazteko ikertu diren tratamenduen eraginkortasuna arratoi ar eta emeetan.

Neurketak serumean

Serumeko TG, kolesterol totala, -HDL eta -LDL, gantz-azido askeak, glukosa, intsulina (HOMA-IR indizearen kalkulua) eta kontrol gluzemikoarekin eta hanturarekin erlazionatutako adipokinen (leptina, adiponectina, TNF-α, CRP, FGF-21, visfatina, apelina, resistina, IL-1β, IL-6, IL-10) mailak aztertuko dira (ELISA).

*Serumeko neurketa guztiak **espektrofotometria edo/eta fluorimetria** bidez egingo dira.*

Neurketak gantz-ehun zurian

Gantz biltegi ezberdinetako adipozitoen tamaina aztertuko da H&E tindaketa eta ondorengo mikroskopio bidezko analisiarekin.

De novo lipogenesia aztertuko da glukosa-6P deshidrogenasa, entzima malikoa, ACC, FAS eta SREBP1-en jarduera entzimatikoa edo proteina espresio/aktibazio maila neurtuaz (Western Blot).

TG-en muntaia DGAT-ren proteina espresioa neurtuz aztertuko da (Western Blot).

Glukosa eta gantz-azidoen kaptazioa aztertuko da CD36, FATP1 eta GLUT-4en proteina espresioa neurtuz (Western Blot bidez). Lipoproteinetako TG-etatik eratorritako gantz-azidoen kaptazioa aztertzeko LPL-ren jarduera entzimatikoa aztertuko da eta PPARγ-ren gene espresioa neurtuko da (RT-PCR bidez).

Lipolisiaren azterketarako, tasa lipolitikoa *ex vivo* neurtuko da eta HSL, ATGL, perilipina eta CGI58-ren espresio proteikoa/aktibazio maila aztertuko dira (Western Blot bidez).

Gantz-ehun zuriaren disfuntzioa analizatzeko erretikulu endoplasmatikoaren estresaren adierazle diren hainbat markatzaile neurtuko dira, baita zitokina hantura eragileak eta antiinflamatorioak ere. Era berean, hantura/hipertrofia markatzaileak adipokinak, intsulinaren seinaleztapen bidea, autofagia eta fibrosia ere aztertuko dira (nagusiki Western Blot bidez).

Azkenik, eta gantz-ehun zuriaren arretze potentziala aztertzeko asmoz, UCP1-en tindaketa erabiliko da ondoren histokimika bidez aztertzeko, eta haren proteina espresioa ere neurtuko da (Western Blot bidez).

*Proiektuaren zati honetan aurreikusitako neurketen zati esanguratsu bat **RT-PCR eta Western Blot** bezalako tekniken erabileran oinarritzen da.*

Neurketak gantz-ehun arrean

Espektrofotometria bidez ehun horretako TG edukia neurtuko da, eta UCP1-aren eta hainbat markatzaile mitokondrialen proteina espresioa edo/eta aktibazioa aztertuko dira (Western Blot bidez).

Ehun honetako adipogenesian, lipolisian, gantz-azidoen kaptazioan, mitokondriogenesian, gantz-azidoen oxidazioan, glukosaren kaptazioan eta UCP1-en sintesian parte hartzen duten transkripzio faktore eta kofaktoreen espresio proteikoa edo/eta aktibazioa maila aztertuko dira (Western Blot bidez).

DIO2, tiroxina hartzaileen eta ehun honetako hainbat batokinen proteina espresioa ere neurtuko dira (Western Blot bidez).

*Proiektuaren atal honetarako aurreikusitako neurketa gehienak **Western Blot** teknikaren erabileran oinarritzen dira.*

Neurketak muskulu eskeletikoan

Ehunaren lipido edukia grabimetria bidez neurtuko da, eta TG-ak, berriz, espektrofotometria bidez.

Intsulinaren seinaleztapen bidean eta glukosaren kaptazioan garrantzitsuak diren proteina ezberdinen espresioa edo/eta aktibazio maila aztertuko dira (Western Blot bidez).

Glukogenoaren metabolismoan parte hartzen duten entzimen aktibitatea neurtzeko, G6PC eta GK entzimak aztertuko dira (espektrofotometria bidez).

*Proiektuaren zati honetan aurreikusitako neurketen zati esanguratsu bat **RT-PCR eta Western Blot** bezalako tekniken erabileran oinarritzen da.*

Oharrak

Ikerketa proiektu honen ezaugarriak direla eta (esperimentazio animalien erabilpena barne hartzen duen zati preklinikoa), ezinbestekotzat jotzen da proiektu honetara batuko den pertsonak aurretiazko esperientzia izatea laborategiko animalien maneiuan (idealki esperimentazio-animalien maneiurako ikastaroak egin izana edo egiten aritzea).

Laborategiko lanaren kasuan, eta kontuan izanik proiektu honetan ehun ezberdinetan (gantz-ehun zuria eta arrea, eta muskulu eskeletikoa) egingo den bide-metaboliko ezberdinen karakterizazioak duen garrantzia, ezinbestekotzat jotzen da proiektura batuko den pertsonak esperientzia (demostragarria) izatea RT-PCR eta Western Blot bezalako biologia molekularreko tekniken maneiuan.