

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Etiopatogenetski mehanizmi eksperimentalne sporadične Alzheimerove bolesti izazvane središnjom primjenom streptozotocina		
Trajanje projekta			
Ključne riječi (najviše do 5)	streptozotocin, sporadična Alzheimerova bolest, inzulinska rezistencija, beta amiloid, GLUT		
	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).	Istraživanje će nastaviti karakterizaciju eksperimentalnog modela sporadične Alzheimerove bolesti (sAB) s ciljem ispitivanja neposrednih neuropatoloških promjena izazvanih intracerebroventrikularnom primjenom streptozotocina (STZ-icv), kao mogućih etiopatogenetskih čimbenika sAB-a. Postojeća terapija sAB-a je simptomatska, uzrok nepoznat, početak polagan bez kliničkih simptoma i pouzdanih dijagnostičkih pokazatelja te se istraživanja etiopatogeneze moraju provoditi na eksperimentalnim modelima. Transgenični miševi prikladan su model za rijetki familijarni ali ne za najčešći sporadični oblik bolesti. Dosadašnjim istraživanjima značajno smo pridonijeli karakterizaciji STZ-icv štakora kao reprezentativnog netransgeničnog sAB modela, pokazavši da su kognitivne/neurokemijske/strukturne promjene slične sAB-u najizraženije 6-9 mjeseci nakon STZ-icv primjene i da moždana inzulinska rezistencija prethodi amiloidnoj patologiji. Istraživanja drugih upućuju i na druge promjene slične onima u sAB-u, posebno na kolinergički deficit, oksidativni stres, smanjeni metabolizam glukoze i astrogliozu u mozgu štakora nađenim već tjedan dana nakon STZ-icv primjene. Na periferiji STZ ulazi u stanice putem nosača za glukozu GLUT2, oštećuje stanice koje sintetiziraju/izlučuju inzulin i smanjuje autofosforilaciju inzulinskog receptora (IR), ali mehanizam središnjeg djelovanja STZ i promjene mozga unutar 24 sata od STZ-icv primjene nisu do sada istraženi. Specifični su ciljevi ispitati tijek nastajanja i progresije neurokemijskih i strukturnih poremećaja u mozgu STZ-icv modela u signalizaciji IR, GLUT ekspresiji i kolinergičnoj transmisiji te amiloidnoj/tau patologiji neposredno unutar nekoliko sati i usporediti ih s onima nađenim nakon duljeg vremena do 3 mjeseca od STZ-icv primjene u različitim regijama mozga štakorskog modela sAB, kako bi se spoznala njihova uzročna povezanost. Istraživanja su dio izrade doktorata pristupnika Doktorskog studija na Medicinskom fakultetu u Zagrebu pod mentorstvom voditelja projekta.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Rezultati predloženog istraživanja pridonijeli bi razumijevanju mogućeg uzroka eksperimentalnog sAB-a kao prvom koraku translacijskih istraživanja etiopatogenetske uloge poremećaja inzulinskog sustava mozga u nastajanju sAB-a. Dugoročno, rezultati bi pridonijeli mogućem razvoju novih lijekova za liječenje sAB te unaprijedili ulogu i kompetitivnost Hrvatske u svjetskoj neuroznanosti posebno u području istraživanja AB. Također, dobiveni rezultati važan su temelj za prijavu novih međunarodnih i domaćih projekata te		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	pronalaženje novih izvora financiranja i suradnju s farmaceutskom industrijom.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Postupci se provode na Wistar štakorima muškog spola, starosti 3 mjeseca (N=110) te C57BL/6 miševima muškog spola, starosti 3 mjeseca (N=66).
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje će se podvrgnuti kratkoj operaciji u kojoj će primiti STZ ili samo otapalo intracerebroventrikularno (icv). Kirurški postupak (rez kože glave duljine do 1 cm i brušenje/stanjivanje kosti lubanje ispod reza u radijusu od 2 mm za potrebe primjene lijeka) provodi se u općoj anesteziji koja se izaziva intraperitonealnom (ip) primjenom ketamina (60 mg/kg) i ksilazina (5-10 mg/kg) pri čemu životinja može osjetiti jedino kratkotrajnu bol od uboda igle. Navedeni kirurški postupak traje ukupno 1 minutu. Obzirom na opseg, vrstu i lokaciju reza kože, primjena miorelaksansa nije potrebna. Pri postupcima vađenja uzoraka krvi iz repne vene te likvora iz cisterne magne za potrebe biokemijskih analiza, životinje ne trpe jaku i dugotrajnu bol jer se isti provode u općoj anesteziji iz koje se životinje više ne bude već ih se usmrćuje (nepovratni postupak). Testiranje kognitivnih funkcija u testu pasivnog izbjegavanja provodi se standardnim postupkom opisanim u literaturi (Myhrer, <i>Brain Res Rev</i> 2003; 41: 268-287) u kojem ulazak u tamni prostor komore (standardnim aparatom Ugo Basile, Comerio, Italija) dovodi do primjene blagog elektrošoka kroz podnu rešetku (0,3-0,5 mA, ovisno o tjelesnoj masi, trajanja 2 sekunde) pri čemu životinje pretrpe samo kratkotrajnu nelagodu bez izazivanja boli. Kognitivne funkcije testirat će se također u testu plivanja (Morris Water Maze test), a anksioznost testom uzdignutog labirinta. Ovisno o pokusu neke grupe će biti žrtvovane odmah nakon operacije (5, 15 i 60 min) dodavanjem još anestetika do duboke anestezije (ketamina >60 mg/kg i ksilazina >10 mg), te dekapitacijom u giljotini obzirom da su mozak uzima za biokemijske i histološke analize. Ostale grupe će se po završetku kirurškog postupka provesti kroz primjerenu postoperativnu skrb smještanjem životinja u zasebne kaveze, ugrijavanjem te nadzorom i praćenjem vitalnih funkcija i tijeka oporavka do buđenja iz anestezije, za potrebe pokusa trajanja 4 tjedna. Nakon navedenog kirurškog postupka životinje se unutar nekoliko sati u potpunosti oporave, s normalnom pokretljivošću bez vokalizacije ili drugih znakova boli. U slučaju potrebe daje se analgetik paracetamol (3 mg/ml per os u vodi za piće). Po završetku čitavog pokusa, sve se životinje usmrćuju dekapitacijom u dubokoj anesteziji (tiopental >50mg/kg /diazepam >6mg/kg, ip), a za potrebe histološke analize još u prethodnoj perfuziji 4% puferiranim paraformaldehidom.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Ispitivanje ima za cilj istražiti biokemijske i histološke promjene u mozgu te kognitivne promjene u štakorskom modelu Alzheimerove bolesti koji je razvijen od strane glavnog istraživača (prof dr sc Šalković-Petrišić) i koristi se već dugi niz godina u istraživanju ove grupe na projektu MZOŠ 108-1080003-0020 i UKF projekt 64/10 čiji je voditelj također bila prof. dr sc Šalković-Petrišić. Radi se o modelu u kojem se štakorima u općoj anesteziji intracerebroventrikularno primjenjuju male doze tvari pod imenom streptozotocin (tzv. STZ-icv model). Za životinjski model Alzheimerove bolesti neophodno je dokazati da postoji kognitivni deficit te je neizbježno provođenje pokusa in vivo i kognitivno testiranje jer je važno korelirati postojeći deficit s nastankom i razvojem ostalih neurokemijskih i citopatoloških promjena u mozgu. Isto je značajno u slučaju ispitivanja terapijskog potencijala pojedinih lijekova kao pokazatelj učinaka ovih lijekova. Također, u akutnim pokusima neophodno je vidjeti nakon primjene STZ u lateralne moždane komore u kojim regijama mozga i konkretno kojima vrstama stanica u tim regijama STZ izaziva štetne učinke, što

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	je jedino moguće u životinjskom in vivo modelu. Zbog navedenog nije moguća zamjena životinja modelima izoliranih organa, kompjutorskim simulacijama ili drugim metodama.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj od 10 štakora po skupini je neophodan jer s jedne strane osigurava reproducibilnije rezultate kognitivnih testova in vivo, a s druge strane, nakon žrtvovanja se 3-4 životinje ostavljaju za potrebe histoloških analiza dok je preostalih minimalno 6-7 životinja po skupini potrebno za biokemijske analize i postupke molekularne biologije kako bi se mogli adekvatno statistički obraditi. Obzirom na vremenske točke koje će se promatrati nakon STZ-icv primjene, važno je uočiti što je moguće preciznije točan slijed nastanka izazvanih promjena kako bi se spoznali etiopatogenetski čimbenici te njihove promjene korelirale s onima nađenim u kasnijem razdoblju do 3 mjeseca. Za pojedinu vremensku točku (ukupno 5 vremenskih točaka, 5, 15 i 60 min, 24 sata i te 1 mjesec nakon STZ-icv injekcije) potrebno je imati STZ-icv skupinu s odgovarajućom kontrolom, dakle 20 životinja po vremenskoj točki. Obzirom da se ispituju akutne biokemijske promjene u mozgu koje mogu biti izazvane i primjenom samog otapala te da je vrijeme nastanka ovih promjena možda različito nakon primjene STZ i otapala, za svaku vremensku točku neophodno je imati pripadajuću kontrolnu skupinu (icv primjena otapala) koja bi omogućila ispravnu komparaciju. Također da bi se isključio utjecaj mehaničke traume same icv injekcije i mogućeg biokemijskog djelovanja samog otapala, potrebno je još dodatno 10 intaktnih životinja koje nisu primile icv injekciju ni STZ niti otapala, koje će se koristiti kao kontrola za sve ostale pokuse. Temeljem navedenog, za 5 vremenskih točaka po 20 štakora uz dodatnih 10 intaktnih životinja, potrebno je 110 štakora. U pokusima na miševima, kako bi se smanjio broj životinja, neće se provoditi histokemijske analize te je broj miševa po skupini 6, odnosno 12 po vremenskoj točki (za 5 točaka N= 60), uz dodatnih 6 intaktnih miševa (ukupno N= 66).
3. Pобољшanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir namjenske ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Životinjama će se osigurati svi potrebni uvjeti okoliša: propisana stalna temperatura i dovoljna veličina kaveza, propisana stalna vlažnost i protok zraka, ciklus izmjene svjetla i tame 12h/12h u skladu s propisima. Prije ulaska u pokus životinje će se navikavati na manipulaciju radi umanjenja stresa. Voda i hrana će im biti ponuđena <i>ad libitum</i> . U slučaju potrebe provođenja OGTT testa, životinje će biti stavljene na gladovanje 8 sati prije toga, što je u literaturi priznato poboljšanje za smanjenje varijabilnosti rezultata mjerenja glukoze u krvi i time osiguravanje standardiziranih rezultata na manjem broju životinja po skupini. Pri provođenju postupaka posebna se pažnja pridaje maksimalnom izbjegavanju patnje pokusnih životinja pažljivim rukovanjem, izbjegavanjem bolnih manipulacija i svih oblika stresa koliko to dopuštaju ciljevi ispitivanja, a po potrebi upotrebom postupaka i sredstava koji ublažavaju ili uklanjaju iste (analgetik paracetamol, 3 mg/ml per os u vodi za piće). Obogaćivanje okoliša tijekom pokusa nije moguće jer dokazano utječe na kognitivne sposobnosti, a upravo je njihov poremećaj glavni simptom u životinjskom modelu AD. Uporaba ovog modela AB sama po sebi predstavlja poboljšanje jer se ne radi o transgeničnim životinjama.