

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Klostridijski neurotoksini i mozak		
Trajanje projekta	1.9.2015-1.9.2017		
Ključne riječi (najviše do 5)	Botulinum toksin tipa A, tetanus toksin, nocicepcija, motorika, migrena		
	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).	Botulinum toksini (BTX) i tetanus toksin (TTX) su najvažniji klostridijski toksini, i među najtoksičnijim tvarima u prirodi. Jedan gram BTX tipa A (BTX-A) može ubiti više od milijun ljudi inhalacijskim putem. Istovremeno, BTX-A se često koristi u terapijske svrhe, a kozmetička primjena je najraširenija (Botox). Danas se primjena BTX-A u određenih vrsta boli povećava. Dugotrajno djelovanje i sigurnost su od naročite kliničke važnosti. Do nedavno se vjerovalo da je osnovni mehanizam antinociceptivnog djelovanja BTX-A vezan uz periferne živčane okončine, a posredovan cijepanjem SNAP-25, proteina uključenog u lučenje neurotransmitora. Rezultati iz našeg laboratorija su prvi pokazali da BTX-A retrogradno putuje s periferije u središnji živčani sustav kroz senzorne neurone, te središnje mjesto djelovanja na bol. Međutim, točan mehanizam je nerazjašnjen. Stoga se naš projektni prijedlog sastoji od 7 glavnih međusobno povezanih ciljeva: I. Naši nedavno objavljeni rezultati sugeriraju povezanost opioidnog i GABA sustava sa središnjim antinociceptivnim djelovanjem BTX-A. Budući da je mehanizam interakcije nerazjašnjen, naši ciljevi će biti: istražiti utjecaj BTX-A na opioidne receptore i opioidne peptide, te uključenost glutamatnih receptora; istražiti ulogu spinalnih i supraspinalnih glija stanica u antinociceptivnom djelovanju BTX-A. II. Ranije smo objavili da BTX-A ispoljava bilateralni učinak u modelima tzv. zrcalne boli. Cilj ovog istraživanja bit će istražiti mehanizam djelovanja BTX-A na bilateralnu bol i moguću interferenciju s procesima središnje senzitivacije. III. Naši preliminarni rezultati također su sugerirali uključenost kapsaicin-osjetljivih neurona u antinociceptivno djelovanje BTX-A. U sklopu ovog projekta istražiti će se detaljnije povezanost kapsaicin-osjetljivih neurona i središnjeg antinociceptivnog djelovanja BTX-A. IV. Nedavno smo pokazali povezanost različitih vrsta trigeminalne eksperimentalne boli s neurogenom upalom		

	moždanih ovojnica. Stoga će cilj ovog projekta biti istraživanje djelovanja BTX-A na trigeminovaskularni sustav i peptid srodan genu za kalcitonin, kao mogući mehanizam djelovanja BTX-A na migrenu. V. Osim djelovanja na senzorni sustav, planiraju se istražiti središnji učinci BTX-A i na motorni sustav, što može doprinijeti boljem razumijevanju mehanizma korisnih učinaka BTX-A u poremećajima pokreta. VI. Osim istraživanja BTX-A, istražiti će se i drugi klostridijski toksin: TTX. Iako imaju klinički suprotne učinke (spastična vs. mlohava paraliza), molekularni mehanizam djelovanja u sinapsi je sličan. Pretpostavljamo da injiciranje malih količina TTX u senzorne živce i ganglije može također utjecati na bol. Predložena istraživanja mogu objasniti učinke BTX-A na kroničnu bol, migrenu i hiperkinetske poremećaje pokreta što može značajno unaprijediti njegovu kliničku primjenu. Kao problemski orijentirano istraživanje zahtijevat će korištenje različitih postupaka i tehnika (bihevioralna istraživanja, Western blot, imunohistokemija, PCR itd.).
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>).	Predložena istraživanja mogu objasniti učinke BTX-A na kroničnu bol, migrenu i hiperkinetske poremećaje pokreta što može značajno unaprijediti njegovu kliničku primjenu.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Štakori, soj Wistar, 540 životinja
U kontekstu onoga što se radina životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Svi predloženi pokusi se klasificiraju kao umjereni , po definiciji Pravilnika o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 055/2013), prilog broj VII
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Istraživanje nocicepcije i analgezije nije moguće provesti <i>in vitro</i> , jer su u ovakvom tipu istraživanja prijeko potrebna bihevioralna mjerenja. Glodavci (miševi i štakori) su najčešće korišteni u istraživanjima nocicepcije i analgezije, s velikim brojem raznih, dobro okarakteriziranih protokola i modela koji pokušavaju oponašati različite tipove boli u ljudi. Također se koriste zbog mogućnosti praćenja bihevioralnih, anatomskih, fizioloških i biokemijskih promjena koje se inače ne mogu pratiti kod ljudi ili kultura stanica. Upravo iz tog razloga, glodavci predstavljaju trenutno najprihvatljivije rješenje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pokusima koristimo minimalan broj životinja, potreban za dobivanje pouzdanih rezultata i zadovoljavanje statističkih kriterija. To zahtijeva 5-6 životinja po eksperimentalnoj grupi u većini pokusa.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su	Životinjama će se omogućiti uvjeti mikrookoliša (dovoljno veliki kavez) i makrookoliša (ciklus izmjene svjetla i tame

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

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.	12/12 h, temperatura 23 C, vlaga 50%) u skladu s propisima i preporukama (npr. obogaćivanje životnog prostora). Radi redukcije stresa, životinju će se na svaki postupak i manipulaciju navikavati prije pokusa, a tijekom mjerenja će se izbjegavati čimbenici poput prejakog svjetla koje uzrokuje anksioznost i stres. Hrana će im biti ponuđena <i>ad libitum</i> osim u vrijeme testiranja praga podražaja (kratki period). Prema dosadašnjem iskustvu, životinje su pokretne i nije im potrebno hranu stavljati u stelju
--	---