

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Terapijski potencijal oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti (Therapeutic potential of oral galactose in experimental Alzheimer's disease) (GALAD projekt)		
Trajanje projekta	rujan 2015. – kolovoz 2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	galaktoza, streptozotocin, intracerebroventrikularno, transgenični miševi, Alzheimerova bolest		
	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).	Projekt ima za cilj ispitati terapijski učinak oralne galaktoze u eksperimentalnim modelima Alzheimerove bolesti (AB). AB je prepoznata kao metabolička bolest s inzulinskom rezistencijom i smanjenim unosom/metabolizmom glukoze u mozgu te je hipoteza da galaktoza nakon unutarstaničnog metaboliziranja u glukozu, može nadoknaditi manjak glukoze u stanici. Preliminarna istraživanja pokazala su da oralna primjena galaktoze, nasuprot parenteralnoj primjeni, sprečava nastajanje poremećaja učenja i pamćenja u štakorskom modelu sporadične AB (sAB) izazvane središnjom primjenom streptozotocina (STZ-icv model). Terapijski učinak i njegova ovisnost o dozi galaktoze i trajanju terapije ispitivat će se na razini kognitivnih funkcija, neurokemijskih i strukturnih poremećaja u STZ-icv modelu sporadičnog oblika i u transgeničnom mišjem modelu familijarnog oblika Alzheimerove bolesti.		
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).	Rezultati predloženog istraživanja pridonijeli bi razumijevanju mogućeg terapijskog učinka oralno primijenjene galaktoze u normaliziranju kognitivnih deficita u eksperimentalnih modela Alzheimerove bolesti. Dugoročno, rezultati bi pridonijeli mogućem razvoju novog terapijskog pristupa za liječenje Alzheimerove bolesti te unaprijedili ulogu i kompetitivnost Hrvatske u svjetskoj neuroznanosti posebno u ovom području istraživanja. Također, dobiveni rezultati važan su temelj za prijavu novih međunarodnih i domaćih projekata te pronalaženje novih izvora financiranja.		
Koje vrste i približni broj	Postupci se provode na Wistar štakorima muškog spola,		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

životinja se očekuje da će se koristiti.	starosti 3-4 mjeseca (N=180) te transgeničnim Tg2576 miševima (N=45) i kontrolnom divljem soju miševa (C57BL/69) (N=45) muškog spola, starosti do 11 mjeseca.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Jednokratna primjena tvari oralno (želučana sonda) i intraperitonealno bez anestezije koja se kao od postupaka jedino provodi u pokusu Exp 1 pripada <u>blagim postupcima</u> (N= 50 štakora). Pokusi Exp 2-4 provode se na štakorima s intracerebroventrikularnom primjenom tvari (N= 130) u dubokoj anesteziji i pripadaju <u>umjerenim postupcima</u>. Životinje će se podvrgnuti kratkoj operaciji u kojoj će primiti streptozotocin (STZ) ili samo otapalo/pufer intracerebroventrikularno (icv) za izradu STZ-icv modela. 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 tiopentala (40 mg/kg) i diazepama (4 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. Po završetku kirurškog postupka s icv primjenom, provest će se primjerena postoperativna 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). Pokusi Exp 5-6 provode se na transgeničnom mišjem modelu Alzheimerove bolesti (N= 45 transgeničnih i 45 „divlji soj“ C57BL/69 miševa), a izrada transgeničnog modela spada u <u>umjerene postupke</u>. Transgenični miševi neće se dizajnirati i uzgajati u matičnoj ustanovi već će se kupiti od kompanije registrirane za izradu i uzgoj transgeničnih životinja te će biti podvrgnuti istim postupcima kao i STZ-icv štakori. Unutar pokusa Exp 3-6 provodit će se: -in vivo kognitivno testiranje (N= 80 štakora i 45 transgeničnih + 45 „divlji soj“ miševa) u testu pasivnog izbjegavanja provodi se standardnim postupkom opisanim u literaturi (<i>Myhrer, Brain Res Rev 2003; 41: 268-287</i>) 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. Ovaj kognitivni test kao i test plivanja (Morris Water Maze Swimming test) kategorizirani su kao <u>umjereni</u>. - neinvazivno slikanje - PET/FDG-scan analiza u dubokoj anesteziji na Institutu Ruder Bošković (.16 štakora i 8 transgeničnih + 8 „divlji soj“ miševa), kategoriziran kao <u>blagi postupak</u> - svakodnevna kratkotrajna socijalna izolacija u pojedinačne kaveze kako bi popili namijenjenu otopinu galaktoze (nakon čega se vraćaju natrag u kaveze s ostalim životinjama izloženim pijenju obične vode) tijekom 2 mjeseca, pripada <u>blagim postupcima</u> (40 štakora i 20 transgeničnih + 20 „divlji soj“ miševa) Za biokemijske analize potrebno je od svih životinja u svim pokusima uzeti uzorke krvi i likvora, a pri postupcima jednokratnog vađenja 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 (<u>nepovratni postupak</u>). 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 (<u>nepovratni postupak</u>).
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 terapijski učinak oralne galaktoze na 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 koristio se već dugi niz godina u istraživanju ove grupe na projektu MZOŠ 108-1080003-0020 i UKF projekt 64/10 te 2 Sveučilišna projekta, 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. Obzirom da postoje 2 oblika Alzheimerove bolesti (sporadični i familijarni) te da je cilj projekta ispitati terapijski učinak galaktoze u oba oblika bolesti.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	potrebno je provoditi in vivo pokuse i na transgeničnim miševima koji predstavljaju model familijarnog oblika bolesti. 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.	Ukupno ima 6 pokusa, 4 na štakorima i 2 na miševima. Prva 2 pokusa imaju 5 skupina (kontrola ili STZ-iev model s jednokartnom primjenom različitih doza/načina primjene galaktoze), a ostalih 4 pokusa po 4 skupine (kontrola i model Alzheimerove bolesti te obje skupine na tretmanu galaktozom). Broj pokusa i skupina po pokusu je minimalan za dobivanje relevantnih podataka o učinku galaktoze u eksperimentalnim modelima Alzheimerove bolesti. Broj od 10 životinja po skupini je neophodan jer s jedne strane osigurava vjerodostojnije i reproducibilnije rezultate kognitivnih testova in vivo, a s druge strane, nakon žrtvovanja se 3-4 životinje ostavljaju za potrebe histoloških analiza dok je minimalno 6-7 životinja potrebno za biokemijske analize i postupke molekularne biologije kako bi se mogli adekvatno statistički obraditi. Broj transgeničnih/divlji soj miševa uvećan je pri nabavi minimalno za ukupno 5 životinja po soju kako bi se tijekom višemjesečnog držanja životinja zbog eventualnih (neočekivanih) gubitaka osigurao konačni broj od 10 po skupini.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeliprimjereniji od drugih, uzimajući u obzirznanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će sepoduzeti kako bi se smanjileštete za životinje.	Životinjama će se osigurati svi potrebni uvjeti okoliša: stalna temperatura od 23°C, dovoljna veličina kaveza, stalna vlažnost od 50%, 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 ponudena <i>ad libitum</i> (osim u pokusa s dugotrajnom primjenom otopine galaktoze za piće u kojima će unutar 24 sata kratkotrajno biti podvrgnuti samo otopini galaktozi za piće u pojedinačnom kavezu, a preostalo vrijeme vodi <i>as libitum</i>). 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. Postupci koji zahtijevaju anesteziju biti će provedeni u općoj anesteziji (tiopental 40 mg/kg + diazepam 4 mg/kg ip, a po potrebi davat će se analgetici (paracetamol 3 mg/ml per os u vodi za piće).