

OBRAZAC 3

Naslov projekta	"Neuroimunomodulacijske i oksidacijske promjene u mozgu štakora nakon združenog izlaganja anestetici i teškim metalima"		
Trajanje projekta	15. 11. 2017. – 15.11.2020.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Alzheimerova bolest, inhalacijski anestetici, teški metali, oksidacijski stres, štakor		
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	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
Nedostatnost podataka o učinku anestetika na nastanak Alzheimerove bolesti te moguća povezanost s nazočnošću teških metala i inhalacijskih anestetika u nastanku ove bolesti je glavni cilj ovog istraživanja. Smatra se da postoje razlike u pojavi oksidacije, upale i oštećenja DNA u drugim tkivima u odnosu na oštećenja moždanog tkiva s obzirom na vrstu i duljinu trajanja anestezije, što bi zasigurno trebalo istražiti. Temeljni ciljevi su izvedeni na osnovu dijelom poznatih i dijelom nepoznatih znanstvenih činjenica navedenih kako slijedi: Pojava Alzheimerove bolesti i demencije povezana je sa procesom starenja. Sama bolest izravno je uzrokovana oksidacijskim stresom te je karakterizirana progresivnim nakupljanjem proteina u netopive filamente koji se odlažu u moždanom tkivu odnosno neuronima i krvnim žilama u obliku plakova. Najvažniji proteini koji se vežu uz pojavu Alzheimerove bolesti su a) Amiloid beta protein (Aβ) koji nastaje iz APP-a (engl. amiloid precursor protein) i b) Tau protein koji je podložan fosforilaciji protein kinazama pri čemu se u hiperfosforiliranoj nerazgradivoj formi nakuplja u neurofibrilarna klupka. Aβ protein i Tau protein između ostalog induciraju nastanak oksidativnog stresa što više sam oksidativni stres uzrokuje generiranje istih proteina. Nastanak oksidativnog stresa pojavljuje se prilikom nadjačavanja antioksidacijskih mehanizama oksidacijskim mehanizmima pri čemu utjecaj egzogenih i endogenih oksidača uzrokuje prekomjerno stvaranje ROS-a i NO-a pa antioksidativni sustav nemože neutralizirati njihov učinak. Prisutnost teških metala, poput željeza, cinka, kobalta, aluminija, bakra također ima ulogu u induciranju oksidativnog stresa, npr. putem Fentonske i Haber-Weissove reakcije, i nastanku neurodegenerativnih bolesti. Metali poput aluminija mogu ubrzati i potencirati nastanak			

	neuralnih oštećenja. Aluminij se smatra jednim od čimbenika koji pridonose oksidativnom štetu i stvaranju ROS-a. Također kod oštećenja moždanog tkiva dolazi do oslobađanja željeza koje sudjeluje u reakcijama nastanka $\text{OH}^\bullet$ radikala iz H_2O_2, lipidne peroksidacije i autooksidacije neurotransmitera pri čemu nastaju epileptična izbijanja, deplecija dopamina i smrt neuralnih stanica šta je dokazano injiciranjem željeznih soli direktno u mozak. Nadalje, neki podaci ukazuju da dugotrajno izlaganje anestetima može biti uzrok nastanka Alzheimerove bolesti. Najčešće korišteni inhalacijski anestetici su Sevoflurane i Isoflurane (po sastavu halogenirani eteri) koji uz besvjesno stanje imaju i analgetski učinak. Oni su pare hlapljivih tekućina, neionizirani, male molekulske mase i liposolubilni pri čemu brzo difundiraju u tkiva i uzrokuju brz uvod u anesteziju i brzo buđenje. Isoflurane i sevoflurane imaju antioksidativna i protuupalna svojstva u plućnom i srčanom tkivu, ali ne i moždanom. Postoji razlika u pojavi oksidacije, upale i oštećenja DNA odnosno oštećenja moždanog tkiva s obzirom na vrstu zahvata i duljinu trajanja anestezije. Međutim, još nije dokazana veza između kliničke izloženosti isofluranom i smanjenja kognitivnih sposobnosti kod ljudi dok je kod miševa dokazano uzrokovanje smanjenja kognitivne sposobnosti.
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>).	Jedan od glavnih ciljeva <i>in vivo</i> istraživanja združenog izlaganja anestetima i teškim metalima na oba spola visokosrodnih štakora Y59 je ukazati da Fe-dekstran ili AlCl_3 uz prisustvo inhalacijskih anestetika poput Sevoflurana ili Isoflurana mogu biti mimikrija patohistoloških promjena Alzheimerove bolesti (AD) za rani stupanj formiranja plakova i neurofibrilarnih snopića u štakorskom modelu AD. Istraživanja sugeriraju da AlCl_3 otvara krvomozdanu barijeru (engl. <i>Blood brain barrier, BBB</i>) mozga i oštećuje čvrste spojeve endotelnih kapilarnih stanica mozga. AlCl_3 i D-gal, narušava strukturnu cjelovitost neuron-glia-krvožilne jedinice i energetski metabolizam; izrazito je toksičan i pomaže akumulaciju Al u mozgu. Nadalje, višak Fe generira oksidativni stres. Toksičnost superoksid aniona (O_2^-) i vodikovog peroksida (H_2O_2) proizlazi iz njihove Fe-ovisne pretvorbe u izuzetno reaktivni hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$) (Haber-Weiss reakcija) koji prouzrokuje ozbiljna oštećenja na membrani, proteinima i DNA. Neurodegeneracija rezultira akumulacijom Fe u mozgu ili poremećajem metabolizma i/ili homeostaze. Spoznaje o posljedicama koje može prouzročiti združeni učinak inhalacijskih anestetika poput Sevoflurana ili Isoflurana s teškim metalima na razvoj patohistoloških promjena Alzheimerove bolesti (AD) za rani stupanj formiranja plakova i neurofibrilarnih snopića u štakorskom modelu AD dati će vrijedna saznanja koja mogu doprinijeti iznalaženju novih zaštitnih lijekova i pripravaka za sprečavanje takvih posljedica. Saznanja o ključnim mehanizmima u razvoju AD daju mogućnost iznalaženja ključnih meta (ili ciljeva) na koje treba djelovati za sprječavanje ili odgodu nastanka bolesti.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Visokosrodni Y59 štakori, 216 životinja
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Usljed injiciranja teških metala i izlaganja anestetikima očekujemo nastanak povećanog oksidativnog stresa i nastanak neurodegenerativnih promjena, točnije širenje neurofibrilarnih promjena od negativnih učinaka na životinje pretpostavljamo da će se pored biokemijskih promjena u količini ukupnih i fosforiliranih tau proteina dogoditi i promjene u ponašanju životinja, točnije poremećaji vezani za procese učenja i pamćenja. Te će se promjene pratiti putem triju testova: T-labirintom (test osjetljiv na disfunkciju hipokampalne formacije), testom prepoznavanja objekata (test osjetljiv na kognitivne promjene u starij životinja) i testom kondicioniranja straha (test osjetljiv na disfunkciju asocijativnog učenja putem frontolimbickih veza). Očekuje se da će se razina težine navedenog postupka mijenjati kroz vrijeme, najviše u zavisnosti od brzine širenja neurofibrilarnog degeneracije, ali i drugih čimbenika. Sveukupno, očekuje se da će i kod uznapredovale razine promjena razina težine odgovarati umjereno teškom postupku. Sve će životinje na kraju pokusa biti žrtvovane, te će se izvršiti njihovo neškodljivo uklanjanje i zbrinjavanje tešina.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Proučavanje utjecaja združenog djelovanja teških metala i inhalacijskih anestetika na razvoj oksidacijskog stresa te njihovo međudjelovanje i nastanak brojnih neuroimunomodulacijskih čimbenika koji pogoduju razvoju patohistoloških promjena na stanicama mozga, ne mogu se proučavati na ljudima, a <i>in vitro</i> istraživanja tih procesa nedostajna su za njihovo razumijevanje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pokusu će se koristiti najmanji mogući broj životinja s obzirom na svrhu istraživanja. Kako bi rezultati dosegli statističku značajnost u analizi kvantitativnih varijabli jednosmjernom analizom varijance s $P < 0.05$, za navedeni se tip istraživanja preporučuje uzeti najmanje 6 životinja po skupini , pa će tako biti učinjeno i u ovom istraživanju.
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.	Životinje u pokusu držati će se u uobičajenim uvjetima za održavanje laboratorijskih životinja (hranjenje, njega), te s obogaćenim okolišem i materijalima za grizenje, trganje i manipuliranje. Za <i>in vivo</i> istraživanja odabrani su štakori jer, za razliku od miševa i mnogih drugih eksperimentalnih životinja, izražavaju svih 6 izo-oblika tau proteina, što je najbliži izražaju tau proteina u čovjeka. Štakorski imunski sustav poklapa se 98-99% sa humanim, što odražava nužnost proučavanja mehanizama humane neuroimunomodulacije na modelima sisavaca. Sa životinjama će se tijekom pokusa postupati u skladu s propisima o dobrobiti životinja. Nakon injiciranja aluminij klorida i/ili Fe-dekstrana životinje će biti izložene inhalacijskim anestetikima: Sevofluranu (1,5%), Isofluranu (1,5%) tijekom 2 h te žrtvovane odmah nakon zadnjeg izlaganja anestetikima u period od 1, 2, 3 i/ili 4 tjedna radi uzimanja krvi (serum) i organa od ciljnog interesa.

