

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Mehanizmi nutrijentom posredovanih učinaka glukagonu sličnog peptida-1 na kognitivne i metaboličke poremećaje u eksperimentalnim modelima neurodegenerativnih bolesti		
Trajanje projekta	listopad 2018. – listopad 2022.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Glukagonu sličan peptid-1, galaktoza, Alzheimerova bolest, streptozotocin, 6-OHDA		
	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 nastavlja prethodna istraživanja o učincima oralne galaktoze u eksperimentalnoj Alzheimerovoj bolesti (AB) provodeći detaljnu karakterizaciju terapijskih učinaka paralelno u eksperimentalnoj sporadičnoj AB (sAB) i Parkinsonovoj bolesti (PB). Neurodegenerativne bolesti (NB) dijele različita zajednička patološka obilježja, a među njima moguća su i kognitivna oštećenja koja su u fokusu predloženog istraživanja. Predloženo istraživanje provest će se na štakorima s intracerebroventrikularno primijenjenim streptozotocinom (STZ-icv) kao sAB modelu i štakorima koji su intrastrijatalno primili 6-hidroksidopamin (6-OHDA), kao PB modelu. Ciljevi projekta su istražiti jesu li akutni učinci jedne oralne doze galaktoze u sAB modelu posredovani samo endogenim glukagonu-sličnim peptidom-1 (GLP-1) i/ili drugim inkretinom, o glukozu ovisnom inzulinotropnom peptidu (GIP), te ispitati proizlazi li terapijski potencijal kronične primjene oralne galaktoze na kognitivni deficit i moguće metaboličke i neuropatološke poremećaje u sAB i PB štakorskim modelima primarno iz kompleksnih učinaka galaktoze (izravni+inkretinima posredovani) ili se radi samo o učincima posredovanim inkretinima. Pomoću ova 2 modela, ovaj 4-godišnji projekt pridonijet će pojašnjenju jesu li terapijski učinci oralne galaktoze, posebno oni posredovani s GLP-1, ovisni o vrsti NB. Za postizanje specifičnih ciljeva, primjereno modelu/pokusu, u uzorcima mozga i/ili crijeva i krvi/likvora, određivat će se parametri oksidativnog stresa, energetskeg statusa, te obilježja amiloidne/AB i dopaminergičke/PB patologije, markeri inzulinske rezistencije u mozgu i metaboličkih poremećaja kao i GLP-1/GIP signalizacije. u 5 akutnih i 5 kroničnih pokusa. Koristit će se standardni testovi za		

	kognitivne i motoričke funkcije, te određivanje homeostaze glukoze/inzulina i postupci neuro-/imunohisto-kemije za određivanje ekspresije proteina. Projekt će donijeti nova znanja i utvrditi novi oblik specifičnog modela-načina liječenja koji više nalikuje mogućoj toksinskoj etiopatogenezi nehereditarne sAB/PB u stvarnom životu. Očekuje se da će rezultati istraživanja omogućiti publiciranje najmanje 2 originalna znanstvena rada, koja će pridonijeti povećanoj kompetitivnosti mladih istraživača i povećati njihove šanse za financiranje budućih projektnih prijava.
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Obzirom na nepoznate uzroke sAB-a i nenasljedne PB, uporabom 2 toksinom inducirana štakorska modela ovih bolesti koji će biti podvrgnuti liječenju oralnom galaktozom, ovim će se istraživanjem uspostaviti oblik modela-terapije koji bolje oponaša kliničku situaciju i ima visoku translacijsku vrijednost za pojašnjenje terapijske uloge nutrijenata u neurodegenerativnim poremećajima povezanim s izlaganjem egzogenim toksinima. Osim razvoja modela ovaj projekt će odrediti mehanizme koji reguliraju neizravni učinak oralne galaktoze na djelovanje endogenog GLP-1 u gastrointestinalnom traktu i/ili mozgu štakorskog modela sAB i PB uz procjenu kognitivnih sposobnosti životinja nakon liječenja lijekovima koji ometaju unos galaktoze u enterocite, te onima koji antagoniziraju GLP-1 i GIP receptore te će pružiti dubinsku karakterizaciju mehanizama koji promiču neuroprotektivne učinke endogenog GLP-1 u štakorskim modelima sAB i PB istraživanjem ekspresije GLP-1R i njegove nizvodne signalne komponente AMPK na razini crijeva i mozga (u hipokampusu i hipotalamusu).
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Postupci se provode na Wistar štakorima muškog spola, starosti 3 mjeseca (N=410)
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 streptozotocin (STZ) ili samo otapalo/pufer intracerebroventrikularno (icv) za izradu STZ-icv modela i 6-hidroksidopamin (6-OHDA) intrastrijatalno za izradu modela Parkinsonove bolesti (PD) (umjereni postupak). 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 (50 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg) pri čemu životinja može osjetiti jedino kratkotrajnu bol od uboda igle. U protokol anestezije uključit će se i opioidni analgetik buprenorfin 0,02 mg/kg sc (<i>IACUC Guidelines</i>). Navedeni 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. Nakon navedenog postupka životinje se unutar nekoliko sati u potpunosti oporave, s normalnom pokretljivošću bez vokalizacije ili drugih znakova boli. U slučaju potrebe daje se analgetik ketoprofen (5 mg/kg per os u vodi za piće). Jednokratna ili višekratna primjena tvari oralno (želučana sonda) i intraperitonealno bez anestezije pripada „blagim“ postupcima, kao i neinvazivna PET-sken analiza u dubokoj anesteziji (plinska – izofluran). Pri provođenju testa tolerancije na glukozu intraperitonealnom injekcijom glukoze (ipGTT) životinje će dan prije testiranja biti podvrgnute gladovanju preko noći i prije intraperitonealne injekcije odredi se bazalna koncentracija glukoze pomoću glukometra iz krvi. Prije uzorkovanja krvi rep se namaže tiopikalnom anestetskom kremom i pričekava se određeno vrijeme dok krema ne počne djelovati. Sa steriliziranim skalpelom se lagano površinski zareže rep, te je jedna kap krvi dovoljna za mjerenje pomoću glukometra. Nakon bazalnog mjerenja životinja se injektira ip s 20% glukozom (2g/kg), te se postupak mjerenja glukoze ponovi mjerenjem 15, 30, 60 i 120 minuta nakon injektiranja stavljajući kap krvi na novu trakicu za glukozu. Daljnji gubitak krvi se sprečava kratkim apliciranjem pritiska na mjesto nakon mjerenja. Na kraju pokusa životinje se vrate u svoj čisti kavez sa dovoljno svježe hrane i vode (<i>Shen et al., Surgery 2012; 149:635-644</i>). 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 (<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. Postupak je kategoriziran kao „umjereni“. Kognitivne funkcije testirat će se također u testu plivanja (Morris Water Maze test) (umjereni postupak), dok će se motoričke funkcije testirati pomoću dva testa: Rotarod test i Beam Walking test (blagi postupci). Po završetku čitavog pokusa, sve se životinje usmrćuju dekapitacijom u dubokoj anesteziji (tiopental >60mg/kg /diazepam >6mg/kg, ip). Za potrebe histološke analize neke se životinje u dubokoj anesteziji prije usmrćivanja
--	--

	prethodno perfundiraju 4% puferiranim paraformaldehidom (nepovratni postupak). Mikrodijaliza će se provesti neposredno prije žrtvovanja životinja kada budu u dubokoj anesteziji bez kasnijeg buđenja (nepovratni postupak). Za ove postupke nije moguće koristiti opioidni analgetik u protokolu duboke anestezije zbog utjecaja istog na mjerene parametre u uzorcima tkiva/tekućina uzetih tijekom postupaka ili neposredno nakon žrtvovanja.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	AB i PB su neurodegenerativne bolesti s kompleksnim biokemijskim promjenama. Za životinjski model Alzheimerove i Parkinsonove bolesti neophodno je dokazati da postoji kognitivni i/ili motorički deficit te je neizbježno provođenje pokusa in vivo i 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 ovaj projekt ima za cilj istražiti učinak oralne galaktoze primarno na kognitivne funkcije, ali i druge patološke procese povezane s AB-i i PB-om, nije moguća zamjena životinja s alternativnim modelima, in vitro modelima i računalnom simulacijom.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Ukupno ima 10 pokusa, po 4 grupe u svakom pokusu i 10 životinja po grupi + jedan preliminarni pokus s 10 životinja (ukupno 410 životinja). Broj pokusa i skupina po pokusu je minimalan za dobivanje relevantnih podataka o učinku galaktoze i raznih inhibitora. Broj od 10 životinja po skupini je neophodan jer s jedne strane osigurava reproducibilnije rezultate kognitivnih i motoričkih 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.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir navedene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Životinjama će se osigurati svi potrebni uvjeti okoliša: stalna temperatura od 23°C, standardna veličina kaveza, stalna vlažnost od 50%, protok zraka te 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 ad libitum (osim u pokusu s dugotrajnom primjenom otopine galaktoze za piće u kojima će unutar 24 sata tijekom 16 sati biti podvrgnuta samo galaktozi, a preostalo vrijeme vodi ad libitum). 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, a po potrebi davat će se analgetici (pri dubokoj anesteziji tijekom otvaranja lubanje za icv/is primjenu dat će se opioidni analgetik buprenorfin 0,02 mg/kg sc (<i>IACUC Guidelines</i>), a tijekom kroničnih pokusa ketoprofen (5 mg/kg per os u vodi za piće).
--	--

