

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

OBRAZAC 3

Naslov projekta	"Interdisciplinarni pristup u istraživanju neuroprotektivnog potencijala kanabinoida u uvjetima oksidacijskog stresa"		
Trajanje projekta	-od siječnja 2020 do prosinca 2023.		
Ključne riječi (najviše do 5)	bakar-sulfat, oksidacijski stres, štakor, kanabidiol		
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 neuroprotektivnom učinku kanabidiola na modelu induciranog oksidacijskog stresa s CuSO₄ (model Alzheimerove bolesti) <i>in vivo</i> te sve veća primjena kanabidiola u neurodegenerativnim poremećajima u klinici su ključni razlog za traženje novih spoznaja neuroprotektivne djelotvornosti kanabidiola, posebice njegov značaj u aktivaciji signalnih puteva i receptora važnih u kongitivnim funkcijama. Hipoteza je da će kanabidiol djelovati neuroprotektivno i da će u podlozi tog djelovanja biti antioksidacijski, antiapoptotski, antiupalni i reparativni mehanizmi. Cilj predloženog projekta jest istražiti neuroprotektivno djelovanje kanabidiola u životinja kod kojih je oksidacijski stres izazvan dugotrajnom primjenom otopine bakar(II)-sulfata. Točnije, primjenom molekularnih tehnika kroz <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> pristupe pojasniti važne molekularne puteve i receptore neuroprotektivnog učinka kanabidiola. Oksidacijskim stresom izazvane promjene (samostalno ili u prisutnosti kanabidiola) pratit će se u hipokampusu i prefrontalnom korteksu zbog njihove značajne uloge u kognitivnim funkcijama. U navedenim regijama odredit će se koncentracije najzastupljenijih neurotransmitera (acetilkolin, serotonin, dopamin, GABA), ekspresija CB1 receptora, razina BDNF-a i kanabidiola, kao i opća aktivnost histon deacetilaza. Detaljno ćemo istražiti ostvaruje li kanabidiol svoje učinke antioksidacijskim mehanizmima (praćenjem razine glutaciona, aktivnosti i ekspresije antioksidacijskih enzima, te oštećenja DNA, lipida i proteina), odnosno putem modulacije različitih neurotransmitterskih sustava i signalnih puteva. Osim toga, analizirat ćemo promjene u ekspresiji sfingolipida, primarno ceramida stearinske i palmitinske kiseline zbog njihove značajne uloge u aktivaciji signalnih puteva koji sudjeluju u pokretanju stanične smrti. Smatramo da će rezultati provedenog istraživanja značajno unaprijediti saznanja o potencijalnoj primjeni kanabidiola u prevenciji i liječenju posljedica oksidacijskog stresa nazočnog u neurodegenerativnim bolestima te da će biti korisna za razvoj novih terapijskih pristupa. Podloga za Projekt: Pojava neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, povezana je sa procesom starenja. Etiologija neurodegenerativnih bolesti nije u potpunosti razjašnjena, ali se povećani oksidacijski stres smatra jednim od temeljnih mehanizama koji doprinosi patološkim promjenama u			

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	različitim neurodegenerativnim oboljenjima. 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 (Sies i sur. Eur. J. Biochem., 1993). To naposljetku uzrokuje oštećenja staničnih makromolekula i organela te poremećaj njihove funkcije. Ove promjene praćene su upalom, aktivacijom i proliferacijom glije, degeneracijom aksona, poremećajem sinapsi i postepenim odumiranjem živčanih stanica. Sve ove promjene remete aktivnost neuralnih krugova i neuralnu povezanost, uzrokujući bihevioralne i kognitivne deficite karakteristične za pojedine neurodegenerativne bolesti. Za Alzhemirovu bolest, koja je najzastupljenija neurodegenerativna bolest, smatra se da je izravno 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 (Brookmeyer i sur. Am J Public Health., 1998). 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 neurofibrilama klupka. Aβ i Tau protein između ostalog induciraju nastanak oksidativnog stresa što više sam oksidativni stres uzrokuje generiranje istih proteina (Grundke-Iqbal i sur. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1986; Behl i sur. Cell., 1994). Prisutnost teških metala, poput željeza, cinka, kobalta, aluminijsa, bakra također ima ulogu u induciranju oksidativnog stresa, npr. putem Fentonске i Haber-Weissove reakcije, i nastanku neurodegenerativnih bolesti (Johnson i sur. Med Hypotheses., 2001; Halliwell i sur. Biochem J., 1984). Metali poput aluminijsa, bakra i željeza mogu ubrzati i potencirati naslanak neuralnih oštećenja preko povećanja razine oksidativnog stresa i stvaranja ROS-a. Također kod oštećenja moždanog tkiva dolazi do oslobađanja željeza koje sudjeluje u reakcijama nastanka OH$\cdot$ radikala iz H$_2$O$_2$, lipidne peroksidacije i autooksidacije neurotransmitera pri čemu nastaju epileptična izbljavanja, deplecija dopamina i smrt neuralnih stanica što je dokazano injiciranjem željeznih soli direktno u mozak (Britton i sur. Int J Hematol, 2002).
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).	Spoznaje o posljedicama koje mogu prouzročiti metali kao CuSO$_4$ na razvoj patohistoloških promjena Alzheimerove bolesti, ali i drugih neurodegenerativnih oboljenja, dati će vrijedna saznanja koja mogu doprinijeti iznalaženju novih zaštitnih lijekova i pripravaka za sprečavanje takvih posljedica. Smatramo da će rezultati provedenog istraživanja značajno unaprijediti saznanja o potencijalnoj primjeni kanabidiola u prevenciji i liječenju posljedica oksidacijskog stresa te da će biti korisna za razvoj novih terapijskih pristupa. Razjašnjavanje molekularnih mehanizama na razini aktivacije različitih neurotransmitorskih sustava i unutarstanične signalizacije bit će vrijedan znanstveni doprinos usmjeren prema pronalaženju učinkovitih farmakoloških pristupa koji bi mogli odgoditi ili usporiti razvoj neurodegenerativnih promjena koje su izazvane oksidacijskim stresom. Očekujemo da će rezultati što će proizaći iz ovog projekta, omogućiti bolje razumijevanje patološkog procesa vezanih uz stanje oksidacijskog stresa, posebice neurofibrilarne degeneracije, te mogući protektivni učinak kanabidiola na sprečavanje razvijanja patološkog procesa karakterističnog za Alzhemirovu bolest. To može biti i temelj budućih pokusa za iznalaženje novih terapijskih postupaka i još boljih potencijalnih neuroprotektivnih spojeva radi sprečavanja neurofibrilarne degeneracije u Alzhemirovoj bolesti.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Visokosrodni Y59 štakori, 120 životinja

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Usljed unosa CuSO₄ očekujemo da će se u moždanom tkivu izazvati stanje oksidacijskog stresa. Pretjerano nakupljanje ROS i RNS uzrokuje oštećenje i promijenjenu funkciju staničnih makromolekula (lipida, proteina i nukleinskih kiselina), kao i cijelih organela, posebice mitohondrija što dovodi do neurodegenerativnih procesa koji su praćeni upalom, aktivacijom i proliferacijom glije, degeneracijom aksona, poremećajem sinapsi i postepenim odumiranjem živčanih stanica. Naposljetku, sve ove promjene remete aktivnost neuralnih krugova i neuralnu povezanost, uzrokujući bihevioralne i kognitivne deficite. Budući je opisani plan pokusa odgovara modelu AB, očekujemo da će 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 oksidacijskog stresa te pojavnost neurodegenerativnih oštećenja. Očekuje se da će se razina težine navedenog postupka mijenjati kroz vrijeme, najviše u zavisnosti od brzine širenja 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 lešina.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Proučavanje oksidacijskih oštećenja izazvanih suviškom bakra, npr stvaranje metal-induciranih Aβ agregata koji se transformiraju do amiloidnih fibrila i vode nastanku plakova i oksidacijskog stresa, te posljedično povećanje neuroimunomodulacijskih čimbenika koji pogoduju razvoju patohistoloških promjena na stanicama mozga, ne mogu se proučavati na ljudima, a <i>in vitro</i> istraživanja tih procesa nedostalna su za njihovo razumijevanje. nadalje neuroprotektivno djelovanje kanabidiola u regulaciji i/ili redukciji nastalih procesa nije moguće <i>in vitro</i>.
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 10 životinja po skupini, pa će tako biti učinjeno i u ovom istraživanju (Awaad i sur. 2016)
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, imaju nasličniji molekularni odgovor na oksidacijski stres, te su uvelike razjašnjeni farmakološki učinci djelovanja kanabidiola. Štakorski imunosni 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.

