

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Metabolička podloga povezanosti moždane inzulinske rezistencije i patologije beta amiloida		
Trajanje projekta	25. siječnja 2020. – 24. siječnja 2025.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Alzheimerova bolest, inzulinski receptor, amiloid β , neuron, astrocit		
	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).	Alzheimerova bolest (AD) progresivna je neurodegenerativna bolest karakterizirana izraženim gubitkom sinapsi i neurona u hipokampusu i cerebralnom korteksu. Osim progresivne demencije, AD je karakterizirana akumulacijom abnormalnih neuritičkih plakova (sastavljenih od agregiranih peptida amiloida beta / Aβ) i neurofibrilarnih vlakana (sastavljenih od agregiranih, hiperfosforiliranih tau proteina). Sve je više dokaza da su inzulinska rezistencija (IR) i metabolička disfunkcija posrednici AD, te da je AD metabolička bolest mozga. Patofiziologija amiloida β i uloga IR u amiloidnoj patologiji još nije razjašnjena; zbog čega će ovo istraživanje biti usredotočeno na razjašnjavanje neurodegenerativnih promjena posredovanih metaboličkim promjenama te razumijevanje IR u kontekstu Aβ patologije. Prijedlog projekta usmjeren je na daljnje razjašnjavanje uloge metaboličke disfunkcije kao ključnog faktora u razvoju AD. Glavni cilj ovog projekta je istražiti ulogu inzulinske rezistencije i amiloida-β na međusobne interakcije neurona i astrocita i razvoj novih modela Alzheimerove bolesti koji će služiti kao platforma za ispitivanje novih terapija. Ovaj cilj ostvarit će se kroz 8 znanstvenih ciljeva predloženog istraživanja: 1. Uspostava istraživačke skupine i laboratorija za kulturu stanica; 2. Uspostava stanične kulture (neurona i astrocita) za istraživanje učinka amiloida beta; 3. Uspostava ko-kultura neurona i astrocita tretiranih amiloidom beta kako bi se istražila uloga interakcije neurona i astrocita u razvoju neurodegenerativnih poremećaja; 4. Istražiti učinak inhibitora inzulinskog receptora u primarnim kulturama neurona i astrocita i 5. u ko-kulturi neurona i astrocita koji će nam pomoći da shvatimo ulogu inzulina u mozgu; 6. Pripremiti novi prijedlog projekta namijenjen za dobivanje sredstava iz drugih izvora financiranja kako bi se proširilo i nastavilo istraživanje započeto ovim projektom; 7. Testirati i uspostaviti novi životinjski model za Alzheimerovu bolest intracerebroventrikularnom primjenom inhibitora inzulinskog receptora. Intracerebroventrikularnom primjenom izravno ćemo uzrokovati inzulinsku rezistenciju u mozgu i testirati razvijeni kognitivni deficit i druge biokemijske parametre relevantne za neurodegeneraciju; 8. Usporediti kognitivni status, metaboličku disfunkciju i neuropatologiju triju različitih životinjskih modela sporadične Alzheimerove bolesti (iev primjena inhibitora inzulinskog receptora, streptozotocina i amiloida-β) te usporediti dobivene		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	rezultate iz životinjskih istraživanja s rezultatima istraživanja na staničnim kulturama s ciljem razjašnjenja mehanizma nastanka bolesti i uspostavljanja novog modela kao platforme za testiranje novih AD lijekova.
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>).	Istraživanje usmjereno na rasvjetljavanje metaboličke neurodegeneracije pridonijet će boljem razumijevanju inzulinske rezistencije u kontekstu beta amiloidne patologije u neurodegenerativnim poremećajima. Objašnjavanje osnovnih mehanizama omogućit će novi uvid u temelj etiopatogeneze bolesti što će pružiti značajne temelje za razvoj novih terapijskih strategija. Diseminacijom rezultata ovog projektnog prijedloga, istraživačka grupa biti će prepoznata na međunarodnoj znanstvenoj sceni, što će omogućiti privlačenje novih suradnika iz renomiranih znanstvenih institucija. Članovi istraživačke skupine će pritom steći nova znanja iz znanstvenih metoda važnih u znanstvenom području njihovog interesa i proširiti svoje znanstvene vidike.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Postupci se provode na komercijalnim staničnim kulturama i Wistar štakorima muškog spola, starosti 3-4 mjeseca (N=120)
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 inhibitor inzulinskog receptora (IRI), amiloid betu (A β), streptozotocin (STZ) ili samo otapalo/pufer intracerebroventrikularno (icv) za izradu. 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 (IACUC Guidelines). 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). Postupak ugradnje sonde za mikrodijalizu (rez kože glave duljine do 2 cm i bušenje kosti lubanje ispod reza u radijusu od 2 mm za potrebe stavljanja sonde) provodi se u općoj anesteziji koja se izaziva injektiranjem anestetika ketamina (50 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg) injekciji pri čemu životinja može osjetiti jedino kratkotrajnu bol od uboda igle. Koordinate postavljanja probe za mikrodijalizu odredit će se stereotaksičnim aparatom (AP = 4.52 mm, L = 2.55 mm, DV = 3.5 mm). Na područje na koži gdje će biti implantirana sonda primjenit će se betadin (10% otopina za kožu). Sprečavanje moguće boli uz pojavu znakova nakostriješene dlake, smanjene aktivnosti, trzanje, gubitak apetita, i/ili promjene vokalizacije, vrši se primjenom analgetika metamizol (300 mg/kg, ip). Sama mikrodijaliza će se provesti sljedeći dan u svrhu mjerenja razine glutamata, inzulina, laktata i amiloida β u izvanstaničnoj tekućini mozga. Direktno u izvanstaničnu tekućinu biti će dostavljen STZ (3mg/kg), A β (10 μ g/kg) i IRI (doza odabrana na temelju prethodnog eksperimenta) dok će kontrolne životinje primiti samo vehikul. Iz istog područja pomoću uređaja za mikrodijalizu biti će uzeti uzorci izvanstanične tekućine. Životinje tijekom mikrodijalize se slobodno kreću i nisu uspavane, te ne pokazuju nikakve znakove boli. Životinje će biti žrtvovane 2 sata nakon izvanstanične administracije STZ, A β i IRI (tiopental 60 mg/kg / diazepam 6 mg/kg ip). Koordinate postavljanja probe za mikrodijalizu odredit će se stereotaksičnim aparatom (AP = 4.52 mm, L = 2.55 mm,

	DV = 3.5 mm). Nakon izvlačenja izvanstanične tekućine (1-2 mikrolitra/min) životinje će biti podvrgnute daljnjem postupku žrtvovanja. Postupak spada u umjerene. Neinvazivna PET-scan analiza, spada u „blage“ postupke te će se provesti 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 topikalnom anestetikom 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 vrte u svoj čisti kavez sa dovoljno svježih hrane i vode (Shen et al., Surgery 2012; 149:635-644). 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 opisanom u literaturi (Myhrer, Brain Res Rev 2003; 41: 268-287) 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 „srednje teški“. Kognitivne funkcije testirat će se također u testu plivanja (Morris Water Maze test) (srednje teški postupak). Po završetku čitavog pokusa, sve se životinje usmrćuju dekapitacijom u dubokoj anesteziji (tiopental >60mg/kg /diazepam >6mg/kg, ip), a za potrebe histološke analize još u prethodnoj perfuziji 4% puferiranim paraformaldehidom. 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.	Alzheimerova bolest je neurodegenerativni poremećaj sa složenim biokemijskim promjenama. Budući da ovaj projekt ima za cilj testirati i uspostaviti novi životinjski model i usporediti ga s dva različita modela i staničnim kulturama, kognitivno testiranje je važno za određivanje deficita učenja i pamćenja. Mjerenje izabranih parametara u izvanstaničnoj tekućini nakon primjene STZ, IRJ ili Aβ važno je za određivanje direktnog utjecaja kemikalija u mozgu na metaboličke i neurotransmitske parametre u životinja koje nisu uspavane i normalno se ponašaju. Primarna kultura stanica koja se koristi u ovom projektu kupit će se od tvrtki Sigma Aldrich, Thermo Fisher ili alternativnih izvora, ali potpunom zamjenom životinja alternativnim modelima (in vitro modeli ili računalna simulacija) nije moguće postići sve ciljeve ovog projektnog prijedloga. Ako su promjene pronađene u štakorskom modelu sAD-a u skladu s promjenama u

	primarnim staničnim kulturama, stanični modeli mogu se koristiti za daljnje projektne primjene i testiranje lijekova umjesto životinja.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Ukupno ima 3 pokusa na životinjama, po 4 grupe u svakom pokusu i 10 životinja po grupi (ukupno 120 životinja). Broj pokusa i skupina po pokusu je minimalan za dobivanje relevantnih podataka o učinku inhibitora inzulinskog receptora i usporedbu tih učinaka s učincima STZ-a i Aβ. Broj od 10 životinja po skupini je neophodan jer s jedne strane osigurava 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.
3. Pобоljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir namjenske ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Životinjama će se osigurati svi potrebni uvjeti okoliša: smještaj 2-3 životinje po kavezu tipa Tip III-H, stalna temperatura od 23°C, stalna vlažnost od 50%, ciklus izmjene svjetla i tame 12h/12h u skladu s propisanim minimalnim standardima (Zakon: NN 102/17; Pravilnik: NN 55/13, dopuna: NN 39/17). Prije ulaska u pokus životinje će se navikavati na manipulaciju radi umanjenja stresa. Voda i hrana će im biti ponuđena 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 (ketamin 50 mg/kg / ksilazin 5 mg/kg ip) uz uporabu opioidnog analgetika (buprenorfin 0.02 mg/kg sc - IACUC Guidelines). U svim postupcima će se, ako je moguće, izbjeći bol, neugoda ili uznemirenost životinja ili će se svesti na minimum, te će se dati analgetici (ketoprofen, 5 mg/kg per os u vodi za piće ili metamizol, 300 mg/kg, ip) kao što je navedeno pod točkom 4.11.3. Tijekom postupka žrtvovanje, životinje će biti u dubokoj anesteziji (tiopental 60 mg/kg / diazepam 6 mg/kg ip).