

OBRAZAC 3

Naslov projekta	In vivo pokus projekta IP-2019-04-3584 ("Uloga krvno-moždane barijere, urođene imunosti i oligomerizacije tau proteina u patogenezi Alzheimerovoj bolesti")		
Trajanje projekta	4 godine (15.01.2020.-15.01.2024.)		
Ključne riječi (najviše do 5)	Alzheimerova bolest, krvno-moždana barijera, mikroglija, neurofibrilarna degeneracija, oligomeri tau proteina		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	<u>da</u>	<u>ne</u>
	Translacijska i primijenjena istraživanja	<u>da</u>	<u>ne</u>
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	<u>ne</u>
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	<u>ne</u>
	Očuvanje vrste	da	<u>ne</u>
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	<u>ne</u>
	Forenzička ispitivanja	da	<u>ne</u>
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	<u>ne</u>
Opišite ciljeve projekta (<i>na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe</i>).	Za Alzheimerovu bolest (AB) ne postoji uzročno liječenje, a brojni su dosadašnji pokušaji intervencije temeljeni na amiloidnoj kaskadnoj hipotezi bili neuspješni. Usporedno s napretkom razumijevanja uloge tau proteina u patogenezi bolesti, metabolizam i transsinaptičko širenje tau proteina sve više postaju i važni terapijski ciljevi. Najranije neurofibrilarne promjene u AB uobičajeno se uočavaju u živčanim stanicama moždanog debla i entorinalne moždane kore, a prikazuju se imunohistokemijski pomoću protutijela na fosforilacijske epitope tau proteina. U sklopu kliničkog dijela projekta najvažniji su nam ciljevi otkrivanje bioloških biljega za rano otkrivanje, praćenje i razlikovanje AB u odnosu na druge primarne uzroke demencije (velikog neurokognitivnog poremećaja). U sklopu eksperimentalnog <i>in vivo</i> dijela projekta, glavni cilj nam je analiza aktivacije mikroglija stanica po inokuliranju sintetskih fibrila tau proteina. Aktivnosti na projektu povezane s navedenim ciljevima su: Aktivnosti na projektu A3.7, A3.15 i A3.23: Imunocitokemijska i Western blot analiza aktivacije mikroglija stanica po inokulaciji sintetskih fibriliziranih tau oligomera u moždano deblo i entorinalnu moždanu		

	koru Wistar štakora i C57BL/6J miševa starosti 3 mjeseca. Aktivnost na projektu A3.8, A3.16 i A324: Analiza remodeliranja krvnih žila mozga Wistar štakora i C57BL/6J miševa mjerenjem stupnja odlaganja amiloida (CAA, <i>cerebral amyloid angiopathy</i>), omjera elastina i kolagena te ekspresije matriks metaloproteinaza 2, 3 i 9 (MMP-2/3/9).
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>).	Očekujemo da ćemo odrediti kako markeri kognitivnog oštećenja koreliraju s poznatim i potencijalnim markerima AD, urođenim imunitetom, upalom i inzulinskom rezistencijom. U okviru ovog cilja, očekujemo da će naš ALZENTIA® sustav za rano otkrivanje AB, kao samostalna kognitivna mjera probira pokazati veću osjetljivost i specifičnost od MMSE i MoCA rezultata. Širom svijeta, MMSE i MoCA su najčešće korišteni testovi za brzi probir pacijenata na BSP i AB. Međutim, MMSE (i MoCA u manjoj mjeri) ima notorno nisku osjetljivost, vjerojatno zato što je izvorno razvijen za razlikovanje organskih od funkcionalnih psihijatrijskih pacijenata (a ne demencije). Također se nadamo da će neki od potencijalnih novih biomarkera, bilo za neurodegeneraciju (kao što je VILIP-1) ili za neuroinflamaciju glijalnog podrijetla (kao što su npr. YKL-40, MCP1, CCL3 i CCL4), biti korisni u budućoj dijagnostici AB. Također očekujemo da ćemo produbiti naše razumijevanje patogeneze bolesti, posebice s obzirom na inzulinsku rezistenciju i ulogu mikrokrvarenja, 2) Očekujemo da ćemo dokazati ili opovrgnuti hipotezu da se KMB disrupcija javlja rano tijekom AB. Nadalje, očekujemo da dobijemo relevantne dodatne informacije od vizualizacije LRP1, VDR1R i RAGE receptora, kanala za akvaporin 4 (AQP4) i kolagena IV u KMB, što će nam pomoći da izvučemo čvrste zaključke o KMB disrupciji, 3) Očekujemo da ćemo procijeniti u kojoj je mjeri neuroinflamacija prisutna u AB mozgu te se nadamo da ćemo moći odrediti M1 fenotip povezan s cerebralnom amiloidnom angiopatijom (CAA), remodeliranjem cerebralnih krvnih žila i ekspresijom matričnih metaloproteinaza 2, 3 i 9, 4) Očekujemo konstrukciju novog luminescentnog reportera za detekciju tau oligomerizacije u kvascu, koji ćemo zatim upotrijebiti za procjenu učinka različitih čimbenika (mogućih inhibitora) na tau agregaciju. Odabranu molekulu s najjačim inhibitornim učinkom planiramo primijeniti u <i>in vivo</i> pokusu. Očekujemo da će i proteotoksični stres i starenje negativno utjecati na tau agregaciju, 5) Iz komparativne genomske hibridizacije odabranih gena očekujemo da će namo pomoći odgovoriti na pitanje postoje li varijacije broja kopija tih gena u BSP i AB bolesnika u odnosu na

	zdrave kontrole i koje su njihovo značenje i moguća uloga u patogenezi AB.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Postupci se provode na Wistar štakorima muškog i ženskog spola starosti 3-4 mjeseca (N= 144) te divljem soju miševa C57BL/6J (N=144) muškog i ženskog spola, starosti 3 mjeseca.
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 sintetskih fibriliziranih tau oligomera i očekivanog širenja 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. Te će se promjene pratiti putem najmanje triju testova: testom otvorenog prostora (procjena spontane istraživačke aktivnosti i ponašanja povezanih s anksioznošću kod glodavaca) T-labirintom (test osjetljiv na disfunkciju hipokampalne formacije) i testom prepoznavanja novog objekata (test osjetljiv na kognitivne promjene u starijima životinja). Očekuje se da će se razina težine navedenog postupka mijenjati kroz vrijeme, najviše u zavisnosti od brzine širenja neurofibrilarne 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.	Mehanizme proučavanja patoloških promjena u sklopu neurofibrilarne degeneracije i transsinaptičkog širenja tau proteina te posljedične aktivacije mikroglija stanica ne može se proučavati na ljudima, a <i>in vitro</i> istraživanja tih procesa nedostatna 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 12 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 prvi dio <i>in vivo</i> istraživanja na ovom projektu odabrani su štakori jer, za razliku od miševa i mnogih drugih eksperimentalnih životinja, izražavaju svih 6 izo-oblika tau proteina, što je najsličnije izražaju tau proteina u čovjeka. Za drugi dio <i>in vivo</i> istraživanja na ovom projektu odabrani su C57BL/6J miševi, kako bi naši rezultati dobiveni na mikrogliji bili usporedivi s prethodno objavljenima za neurone i astroglija stanice.

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	Sa životinjama će se tijekom pokusa postupati u skladu s propisima o dobrobiti životinja. Životinje će tijekom injiciranja sintetskih fibriliziranih tau oligomera, te prije žrtvovanja, biti anestezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije ketamina i ksilazina.
--	---

Osoba odgovorna za provođenje projekta na životinjskom modelu i njegovu usklađenost s odobrenjem projekta: