

## НЕТЕХНИЧЕСКО ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОЕКТ ЗА РАБОТА С ОПИТНИ ЖИВОТНИ

**ТЕМА: РОЛЯ НА КИТОРФИНА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ И ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА БОЛЕСТТА НА АЛЦХАЙМЕР**

Финансиран от МУ- София, Съвет по Медицински Наука, Грант 2016 г

Авторски колектив: Ръководител: Проф. д-р Бойчо Василев Ланджов, дм  
Членове на изследователския екип: Доц. д-р Лина Георгиева Малинова, дм; д-р Александър Асенов Илиев, дм; д-р Станчо Стефанов Станчев; д-р Христина Цанкова Ангелова; Доц. Даниела Маринова Пехливанова, Доц. Елена Борисова Джамбазова

НАИМЕНОВАНИЕ НА ПРОЕКТА	РОЛЯ НА КИТОРФИНА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ И ХИСТОЛОГИЧНИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРЕДИЗВИКАНИ ОТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА БОЛЕСТТА НА АЛЦХАЙМЕР		
Продължителност на проекта	1 година - от 27.05.2016 г.		
Ключови думи	Болезт на Алцхаймер, киторфин, поведение, памет и обучение, хипокампус		
Цел на проекта (в съответствие с чл. 4 на Наредба 20 от 1 ноември 2012г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им)	Фундаментални научни изследвания	Да	Не
	Транслационни или приложни изследвания		Не
	Разработване, производство или изпитване на качеството, ефективността и безопасността на лекарства, храни и фуражи и други вещества или продукти		Не
	Защита на природната среда с оглед опазване здравето на хората и животните и тяхното благосъстояние		Не
	Изследвания, насочени към опазване на биологичните видове животни		Не
	За обучение с цел придобиване, поддържане или подобряване на професионалните умения в средните специални училища, колежите или висшите учебни заведения		Не
	Съдебномедицински изследвания		Не
Поддържане на колонии от генетично изменени животни, които няма да бъдат използвани в други опити		Не	

<p><b>Описание на целта на проекта:</b> (нови научни постижения, медицински изследвания и др.)</p>	<p>Целта на настоящия проект е да се проучи ролята на невропептида киоторфин (КТР) – невропептид/невромедиатор в ЦНС, в поведенческите и хистологични изменения предизвикани от експериментален модел на болестта на Алцхаймер (AD).</p> <p>Болестта на Алцхаймер (AD) е широко разпространено невродегенеративно заболяване, свързано с прогресивна загуба на паметта, която се проявява след продължителна пресимптоматична фаза. Интрацеребро-вентрикуларното (icv) инжектиране на стрептозотозин (STZ) у плъхове е един от утвърдените експериментални модели на AD. В процеса на търсене на нови биомаркери за ранна диагностика на заболяването, е установено понижено ниво на ендогенния дипептид КТР в цереброспинална течност на хора болни от AD, което е съпроводено с повишено съдържание на фосфорилиран тау-протеин. Нашата хипотеза е, че КТР играе определена роля в патофизиологията на заболяването. Изследванията в предложения проект представляват продължение на предишни наши експерименти, които показаха, че КТР като пептид невромедиатор и невромодулятор в ЦНС, играе съществена роля в регулацията на поведенческите отговори и възстановяването на нарушената хомеостаза при стрес. Наред с данните за аналгетичното и невромодулаторно действие на КТР, в литературата съществуват данни и за потенциалния му невропротективен ефект. В достъпната ни литература не намерихме данни за механизмите, лежащи в основата на ефектите на КТР в процесите на запаметяване и невродегенеративните изменения свързани с болестта на Алцхаймер. Това ни даде основание да разширим изследователската си дейност и да си поставим за цел да проучим ефектите на екзогенно приложен КТР върху процесите на обучение и консолидация на паметта, както и участието му в процеса на развитие на невродегенеративните изменения свързани с AD.</p> <p><b>ИЗПОЛЗВАНИ ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ МЕТОДИ:</b> За изпълнението на нашата цел ще използваме експериментален модел на AD (STZ, icv) у плъхове, стереотаксично имплантиране на водещи каниולי в латерален мозъчен вентрикул, субхронично инжектиране на КТР (icv), след което ще се използват поведенчески методи (open field, plus maze, rota rod, paw pressure, forced swimming test, step through, T-maze) за изследване ролята на КТР. След транскардиална перфузия с параформалдехид, ще се изготвят мозъчни срези за хистологично изследване на А<math>\beta</math> плаките с Congo red.</p>
<p><b>Потенциални ползи от осъществяването на проекта:</b> (ползи за здравето на човека и животните, научни постижения и др.)</p>	<p>Данните за ролята на третирането с КТР върху патологичните процеси свързани с развитието и последствията от AD биха разширили знанията за патофизиологията на невродегенеративното заболяване, както и потенциала на дипептида като биомаркер за AD. Резултатите ще имат и приложна значимост при синтезирането на съединения производни на КТР свързана с по-пълното характеризиране на цялостния ефект и потенциалните ползи от прилагането му върху процесите съпровождащи паметта и обучението.</p>
<p><b>Вид и брой на опитните животни, които се очаква да бъдат използвани в проекта да бъдат използвани в проекта</b></p>	<p>40 бр. мъжки плъхове Wistar, възраст 2 месеца (млади, полово зрели), разделени рандомизирано в четири групи: Контроли, инжектирани със стерилен физиологичен разтвор (10 плъха); Контроли, инжектирани с КТР (10 плъха); AD, инжектирани с физиологичен разтвор (10 плъха); AD, инжектирани с КТР (10 плъха).</p>

<p><b>Очаквани неблагоприятни ефекти, вероятното ниво на тежест на опитите и увреждане на животните, както и съдбата на животните след приключване то на опитите</b></p>	<p>Експериментален модел на AD ще бъде предизвикан чрез интрацеребровентрикуларно инжектиране на стрептозотоцин в доза 3 мг/кг телесна маса, разтворен в цитратен буфер, двукратно, с интервал от 48 часа между двете инжекции (Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. J Neural Transm (2013) 120:233–252). Контролните и третираните животни ще бъдат подложени на неинвазивни изследвания - поведенчески методи за анализ на общата двигателна активност и координация, болкова чувствителност, състоянието на безпокойство и депресия (open field, plus maze, rota rod, raw pressure), пространствена и дълготрайна памет (Т-образен лабиринт, Step through) на фона на третиране с пептида киторфин (КТР, потенциален невропротектор). Имплантирането на водеща канюла в латерален мозъчен вентрикул ще се проведе под пълна наркоза (кеталар 80 мг/кг, интрамускулно и ксилазин 4 мг/кг, интраперитонеално), съгласно общоприет стереотаксичен метод (Yin C, Deng Y, Gao J, Li X, Liu Y, Gong Q. Icariside II, a novel phosphodiesterase-5 inhibitor, attenuates streptozotocin-induced cognitive deficits in rats. Neuroscience, Volume 328, 22 July 2016, Pages 69–79).</p> <p>За контролните плъхове, съгласно Чл. 43 (1) на Наредба № 20 /01.11.2012 г, и в съответствие с Раздел 2 от Приложение 8 на Наредбата, тежестта на опита е лека. За животните с модел на AD тежестта на опита е средна. Продължителността на целия експеримент е три месеца, което е съобразено с литературните данни за развитие на първоначалните симптоми на AD, но се избягват неблагоприятните физиологични и емоционални ефекти в крайната фаза на заболяването. В края на експериментите плъховете ще бъдат евтаназирани чрез дълбока наркоза /кеталар 80 мг/кг и ксилазин 4 мг/кг/ и последваща транскардиална перфузия с параформалдехид, след което определени мозъчни структури (хипокамп и мозъчна кора) ще бъдат екстрахирани и изследвани за анатомични, хистологични и биохимични изменения. След приключване на експериментите биологичните отпадъци ще се изгарят в инсинератор.</p>
<p><b>Въвеждане на принципите на заместване, намаляване и облекчаване</b></p>	
<p><b>1.Заместване:</b> Обяснете защо е необходимо използването на опитни животни и защо не могат да бъдат приложени алтернативни методи</p>	<p>В проекта се използват експериментални животински модели на тежки социално-значими заболявания у хора (Болест на Алцхаймер, деменция), които не могат да бъдат заместени с алтернативни експерименти in vitro, или компютърно или друго алтернативно моделиране.</p>
<p><b>2. Намаляване:</b> Обяснете как е осигурено използването на минимален брой животни</p>	<p>Броят на животните е определен на базата на нашия и чужд опит в подобни проучвания, за да може броят им в отделните групи (10 бр.) да позволи надеждна статистическа обработка на получените експериментални резултати, особено при поведенчески изследвания. Редуциране на предвидения брой животни в групите крие риск от недостатъчност на данните за статистическата им обработка.</p>
<p><b>3. Облекчаване:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Обяснете избора на животните и защо избраният модел на опитната постановка е най-облекчен;</li> <li>➤ Обяснете основните мерки, които са предприети за намаляване на страданието на животните</li> </ul>	<p>Плъховете от породата Wistar се използват в голям брой експериментални постановки за проследяване на различни патологични промени. Всички животни се разпределят по три в специални клетки за отглеждане на малки гризачи (Tecniplast, Italy), в отделно помещение с контролирани условия - осигурен свободен достъп до стандартна храна за гризачи и питейна вода, контролиран цикъл на осветление (12ч светло/12 ч тъмно) и постоянна температура (22-24°C). Преди началото на експерименталните процедури, животните се хабитуират към експериментатора посредством ежедневно хендлиране. За животните с експериментален модел на АБ ще се полагат специални грижи. Инвазивните въздействия (имплантиране на мозъчни канюли за интрацеребровентрикуларно инжектиране) у 20 броя мъжки плъхове (10 контролни и 10 третиран с КТР), ще се осъществяват под наркоза /кеталар 80 мг/кг, интрамускулно и ксилазин 4 мг/кг, интраперитонеално/, с постоперативно третиране с НСПВС. При необходимост ще се приложи 5 % лидокаин локално върху раната.</p>