

OBRAZAC ZA PRIJAVU
ZNANSTVENOG PROJEKTA

2006. godina - verzija 8.10

OPIS ISTRAŽIVANJA

9.0 PLAN, POSTUPCI I METODE ISTRAŽIVANJA

9.1 Pretpostavka (hipoteza, 5 000 znakova):

1. Spinalni neuroni i osjetna inervacija srca

Nedvojbeno se može ustvrditi da spinalni gangliji značajno učestvuju u inervaciji svih dijelova srca [5] [6]. Također je vrlo vjerojatno da su funkcionalno različiti dijelovi srca inervirani neuronima spinalnih ganglija koji pripadaju specifičnim podskupinama (subpopulacijama). Retrogradne neuralne boje injicirane u miokard srčanih klijetki obilježiti će veći broj živčanih stanica spinalnih ganglija nego iste injekcije u bilo koje druge dijelove srca [7]. Zahvaljujući retrogradnim bojanjima, utvrđeno je da se u srce projiciraju neuroni ganglija od C6 do T7 (gangliji T2- T4 imaju najveći broj obojanih stanica), i da su kod toga varijacije između vrsta zanemarive [8] [7] [9]. Unatoč činjenici da o spinalnoj i vagalnoj osjetnoj opskrbi srca postoji podosta podataka, detaljan opis tzv. organotopske inervacije (sa točnim brojem i raspodjelom neurona koji se projiciraju u funkcionalno i anatomske različite djelove srca) kod štakora (a ni kod drugih vrsta) prema našim spoznajama još nitko nije napravio. Uvjereni smo da je poznavanje točne i detaljne organizacije aferentne spinalne inervacije prvi i osnovni preduvjet za bilo kakve postupke proučavanja 'srčanog osjeta'.

Hipoteza 1: Istraživanja kojima ćemo (po prvi put) kompletirati sliku osjetne inervacije srca, počivaju na pretpostavci da se živčane stanice koje izgrađuju središnji i periferni segment spinalne aferentne opskrbe srca projiciraju na funkcionalno različite dijelove srca (koronarne žile, provodne i radna mišićna vlakna, unutar-srčani gangliji i sl.) pa stoga imaju različite topografske, morfološke i neurokemijske karakteristike.

2. Osjet boli iz srca

Činjenica da operativno uklanjanje spinalnih ganglija vrlo značajno utječe na pojavu i smanjenje intenziteta anginozne boli [10] govori da spinalni gangliji imaju ključnu ulogu u prenošenju bolnih podražaja iz srca. Visceralni osjet iz srca se prenosi do središnjeg živčanog sustava živčanim vlaknima koji pripadaju jednoj od dvije vrste: mijeliniziranim A δ -vlaknima malog dijametra i brze provodljivosti ili nemijeliniziranim, sporo provodljivim C-vlaknima. Oko 56 % vlakana predstavljaju spontano aktivna mijelinizirana A δ -vlakna, koja su ritmično aktivna i sinhronizirana sa srčanim ciklusom [11]. Ostatak čine tzv. 'tiha' C-vlakna koja se aktiviraju spontano i nevezano za srčani ciklus [11].

Hipoteza 2: Zahvaljujući podacima iz literature možemo zaključiti da postoji velika skupina A δ - i C-afherentnih spinalnih vlakana koji imaju receptorske projekcije u lijevoj klijetki, a na osnovi razlika u njihovim elektrofiziološkim i morfološkim karakteristikama možemo pretpostaviti da se projiciraju na različite dijelove klijetki i da imaju različite (i prepoznatljive) neurokemijske karakteristike.

3. Neurokemijske karakteristike spinalnih neurona koji se projiciraju u srce

Neurotransmitter Supstancija P (SP) je identificiran u nemijeliniziranim C-vlaknima miokarda i epikarda klijetki, a vlakna potječu od spinalnih ali i od vagalnih (nodoznih) ganglija [2]. Poznato je da SP učestvuje u srčanom boli uzrokovanoj adenozinom [12], a A1 i A2 adenzinski receptori, koji su uz receptore za SP locirani na subepikardijalnim živčanim završecima u području klijetki, pokazuju toničku aktivnost u normalnom stanju. U slučaju ishemije ovi se receptori znatno jače aktiviraju [13].

Neurotransmitter CGRP, koji je također identificiran kao marker osjetne inervacije, često se nalazi u istim živčanim vlaknima kao SP [2] [14]. SP/CGRP kombinacija u aferentnim neuronima srca štakora i zamorca smatra se 'markerom' za nemijelinizirana osjetna vlakna [15].

Hipoteza 3: Kombinacija SP i CGRP neurotransmitera će nam poslužiti kao indikator vlakana za prijenos bolnih podražaja iz srca, a u kombinaciji sa indikatorima drugih neuroaktivnih tvari (isolectin B4 neurofilament protein 52) moći ćemo sa sigurnošću razlučiti visceralne završetke za bol.

4. Osjetna inervacija promjenjenog srca

Promjene karaktera spinalne osjetne inervacije će se pratiti na modelima ventrikularne ishemije, šećerne bolesti i starenja (svi od velikog kliničkog značaja) kako bi se razumijela morfološka podloga problema akutne ishemijske boli kao i fenomen 'nijeme' srčane ishemije tj. bezbolnog srčanog napada koji se često javlja kod dijabetičara i starih osoba. Promjene u koncentraciji katekolamina [16], smanjenje broja intrinzičnih neurona u srcu i promjene u njihovoj strukturi [17] kao i propadanje nociceptivnih vlakana [18] (ili kombinacija navedenih) su mogući uzroci promjena u detekciji srčane boli.

Hipoteza 4: Akutna i kronična ishemija, dijabetes i starenje imaju različit utjecaj na dijelove 'afherentnog živčanog sustava' srca, a promjene se mogu prikazati i kvantificirati i objasniti neuro-morfološkim metodama.

9.2 Postupci, protokol i plan istraživanja (10 000 znakova):

POSTUPCI

Pokusne životinje

Sprague-Dawley (SD) štakori će se koristiti u svim planiranim pokusima. Unatoč činjenici da je organizacija živčane opskrbe srca kod ove vrste dobro istražena, mnoga pitanja (posebice u svezi osjetne inervacije) su još uvijek otvorena. Modeli šećerne bolesti i starenja na ovoj vrsti su standardizirani i prihvaćeni kao relevantni reprezentanti ovih stanja kod ljudi.

Prije rada na životinjama, dopusnica će biti ishoda od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Mikrokirurški pristupi ciljnim tkivima

Precizne aplikacije retrogradnih neuralnih boja u ciljne organe ili tkiva (različiti dijelovi srca te grudni spinalni gangliji) moguće su jedino primjenom delikatnih kirurških zahvata. Trans-dijafragmatičkim pristupom (opisan u mom laboratoriju [19]) boje će se injicirati zid lijeve ili desne srčane klijetke. Ciljni dijelovi srčanih komora se injiciraju kroz ošit (preko peritonealne šupljine) bez narušavanja integriteta pleuralne i perikardijalne šupljine. Trans-torakalnim pristupom injicirati će se zidovi srčanih pretklijetki, područje oko SA čvora te subepikardijalni prostori uz glavne koronarne arterije a ovaj pristup će se koristiti i za manipulaciju prednje interventrikularne koronarne arterije zbog izazivanja akutne i kronične ishemijske promjene miokarda. Nakon anestezije štakor će biti intubiran arterijskim kateterom i spojen na respirator. Kroz mali otvor u pleuri i perikardu vizualizirati će se ciljno područje srca i injicirati tj. manipulirati u smislu konstrikcije koronarne arterije. U pokusima sa reverzibilnom ishemijom konstrikcija lumena vršit će se 3 puta (po 5 minuta) tijekom jednog sata, a kod ireverzibilne ishemije lumen koronarne arterije će se trajno zatvoriti omčom oko grane koronarne arterije. Okluzija koronarne arterije u oba modela će biti potvrđena utvrđivanjem pojave subepikardijalne cijanoze i hipokinezije. Dorzalni gangliji će se prikazati unilateralnom laminektomijom i injicirati anterogradnom neuralnom bojom (0,5-1 μ l) uz pomoć staklenih mikroelektroda.

Životinjski model šećerne bolesti

Šećerna bolest će se odraslim štakorima (200-250 g.) izazvati upotrebom svježe pripremljenog streptozotocina (65 mg/kg tjelesne težine) u 0.01M citratnom puferu u koncentraciji od 24 mg/ml puferirane otopine. Kontrolne životinje istog spola i dobi će biti injiciranje istom količinom sterilne fiziološke otopine. Svaka životinja će biti anestezirana i injicirana jednom dozom streptozotocina ili fiziološke otopine kroz jugularnu venu. Dijabetičke i kontrolne životinje će biti vraćene u štalu i njegovane uz konstantno promatranje tako da prežive 6, 12 i 24 mjeseca. Količina glukoze u krvi će se povremeno mjeriti uzimanjem uzorka iz repa, a štakori će se smatrati dijabetičnim kad koncentracija glukoze u krvi pređe 400mg/100ml.

Životinjski model starenja

Štakori u dobi od 24 mjeseca se smatraju ekvivalentom osamdesetogodišnjaka kod ljudi. Optimalnom njegom, restriktivnom dijetom i stimulacijom aktivnosti Sprague-Dawley štakori bez problema dožive ovu dob u dovoljno dobroj tjelesnoj spremnosti za pokuse.

Smatram važnim napomenuti da kao voditelj prijedloga projekta posjedujem dugogodišnje iskustvo (12 godina) rada na ovom soju životinja i tijekom tog vremena sam se upoznao sa detaljnom štakorskom anatomijom te razradio i opisao mikrokirurške pristupe raznim ciljnim organima u području glave i vrata te grudne i trbušne šupljine.

Bojanja retrogradnim i anterogradnim neuralnim bojama

Neuralne boje koje će biti upotrebljene su: β -subunit of cholera toxin, Rhodamine Dextran (3000MW), Fast Blue (FB) i FluoroGold (FG). Shodno protokolu biti će injicirane samostalno ili u kombinacijama.

Imunohistokemijske metode

Koristiti će se Primarna antitijela za detekciju Isolectina B4, Neurofilament proteina (N52), Calcitonin Gene Related Peptide-a (CGRP) zatim Cholera Toxin β subunit (CTb), Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5), Substance P (SP), Tyrosine Hydroxylase (TH) i Choline Acetyl-Transferase (ChAT), a njihova specifična lokalizacija će se prikazati fluorescirajućim sekundarnim antitijelima (Texas Red, Fluorescein isothiocyanate (FITC) i Biotin u kombinaciji sa Streptavidin Cy5). Sva uklopljena tkiva će se promatrati pod fluorescijskim mikroskopom (Olympus) opremljenim filterima za vizualizaciju Texas Red, Fast Blue (AMCA) i FITC.

PROTOKOLI

1. Razlikovanje osjetnih neurona koji inerviraju funkcionalno različite dijelove srca

Projekcijski-specifične podgrupe osjetnih neurona će se razvrstati prema njihovoj raspodjeli u ganglijima, broju, veličini i neurokemijskim osobitostima.

Protokol 1a: Nakon injiciranja 1) regije oko SA čvora, 2) perivaskularnog subepikardija (oko prednje interventrikularne grane lijeve koronarne arterije), 3) područja lijeve i desne aurikule te 4) prednjih zidova lijeve i desne srčane klijetke spinalni gangliji od C7 do T5 nivoa će se sakupiti, očistiti od vezivne ovojnice i istražiti pod fluorescencijskim mikroskopom. To će omogućiti izradu preciznih neuronskih 'mapa' za svaki gangli i svaki injicirani dio srca.

Protokol 1b: Rezovi ganglija sa retrogradno obojenim neuronima će se obojati (koristeći dvostruku imunohistokemiju) da se ustanovi prisustvo, odsustvo ili kolokalizacija neuroaktivnih tvari/markera: isolektin B4, za identifikaciju malih non-peptidergičkih neurona; b) CGRP i/ili SP za identifikaciju malih peptidergičkih neurona i c) neurofilament protein (N52) za identifikaciju mijeliniziranih neurona. Protokol 1c: Retrogradno obojeni neuroni (poznatih projekcija) će tada biti dodatno podijeljeni prema svom neurokemijskom sastavu (koji je indikator njihove funkcije).

Plan istraživanja: Pokusi uključeni u protokol 1 će se izvoditi navedenim redoslijedom kako bi se napravili profili spinalne osjetne inervacije srca za svaki funkcionalno-različit dio srca i da bi se izvršila podjela spinalnih neurona u podgrupe sa definiranim projekcijama i neurokemijskim biljezima.

2. Organizacija perifernih živčanih završetaka nakon anterogradnih bojanja 'srčanih' spinalnih ganglija

Ovim pristupom će se omogućiti opis gustoće i specifičnih projekcija spinalnih aferentnih završetaka neurona lociranih u spinalnim ganglijima sa najvećim brojem 'srčanih projekcija' (T1-T3).

Protokol 2a: Nakon aplikacije anterogradne boje u gore navedene spinalne ganglije, narezani slojevi srčane stijenke predklijetki i klijetki će se pregledati kako bi se ustvrdila raspodjela, gustoća i oblik označenih živčanih završetaka. Izraditi će se 'inervacijske mape' za sve važne dijelove srca.

Protokol 2b: Identificirani živčani završeci će se obojati po istom scenariju kao u protokolu 1b.

Protokol 2c: Živčani završeci primarnih spinalnih aferentnih neurona će se podijeliti prema svom neurokemijskom sastavu, a ovi podaci će se objediniti sa podacima o specifičnoj raspodjeli vlakana u stijenci srca i sa njihovim porjeklom (nivo injiciranog ganglija).

Plan istraživanja: Pokusi uvršteni u protokol 2 planirani su ovim redom kako bi se kvalitativno i kvantitativno mogla utvrditi specifična područja inervacije najvažnijih spinalnih ganglija.

3. Utjecaj akutne i kronične ishemijske na broj i kompleksnost osjetnih živčanih završetaka u 'ozlijeđenim' dijelovima srca

Protokol 3a: Protok krvi kroz srednji dio prednje interventrikularne grane lijeve koronarne arterije će se zatvoriti tri puta po 5 minuta (kroz period od 1 sat) da bi se izazvala akutna reverzibilna ishemijska miokarda. Nakon toga će ishemijska regija srca biti injicirana sa FB a susjedna normalna stijenka klijetke sa FG retrogradnom bojom i životinja će biti omogućen oporavak. Broj retrogradno obojenih neurona kao i promjene u njihovim neurokemijskim karakteristikama će biti utvrđene a razlike između 'ozlijeđene' i normalne stijenke će biti analizirane.

Protokol 3b: Protok krvi kroz srednji dio prednje interventrikularne grane lijeve koronarne arterije će se trajno zatvoriti sa ciljem izazivanja trajne lokalne ishemijske (infarkta miokarda) u prednjem zidu lijeve i desne klijetke.

Nakon toga će se ishemijska i normalna regija srca injicirati kao u protokolu 3a. Nakon oporavka životinja i perfuzijske fiksacije, 'ozlijeđena' regija će biti uspoređena sa zdravim dijelovima miokarda a promatrati će se broj i neurokemijske karakteristike završnih živčanih vlakana dok će se spinalni gangliji analizirati kao u protokolu 3a.

Protokol 3c: Rezultati akutne reverzibilne i kronične ireverzibilne ishemijske promjene će se usporediti međusobno a kao kontrola će služiti rezultati i analiza iz protokola 1 (vidjeti gore).

4. Utjecaj šećerne bolesti na broj i kompleksnost osjetnih živčanih završetaka u stijenci klijetki

Pokusi opisani u protokolu 1 (posebice injiciranje klijetki) će se ponoviti na dijabetičnom životinjskom modelu sa ciljem opisivanja utjecaja ovog poremećaja metabolizma na broj, kompleksnost i neurokemijske karakteristike spinalnih osjetnih živčanih završetaka u miokardu klijetki. Osim toga, reprezentativne regije miokarda dijabetičnih životinja će se analizirati na broj, kompleksnost i trendove međusobnih omjera različitih neurokemijskih grupa a dobiveni rezultati će se usporediti s odgovarajućim, dobro istraženim regijama miokarda normalnih životinja iz protokola 1 kao i s rezultatima na ishemijskim modelima.

5. Utjecaj starenja na broj i kompleksnost osjetnih živčanih završetaka u stijenci klijetki

Pokusi opisani u protokolu 1 će se ponoviti na životinjskom modelu starenja sa ciljem opisivanja utjecaja ovog procesa na broj, kompleksnost i neurokemijske karakteristike spinalnih osjetnih živčanih završetaka u miokardu klijetki. Rezultati će se usporediti s normalnim životinjama te s ishemijskim i dijabetičkim modelom.

Kao voditelj ovog prijedloga projekta posjedujem 14-godišnje iskustvo korištenja složenih imunohistokemijskih metoda (jeno-, dvo- i trostruko bojanje) na nivou fluorescencijskog i elektronskog mikroskopa, a rezultati ovih pokusa su publicirani u ponajboljim neuro-morfološkim časopisima.

9.3 Svrha i ciljevi predloženog projekta istraživanja (2 500 znakova):

Cilj protokola 1 je potvrda pretpostavke da funkcionalno različiti dijelovi srca primaju kvalitativno i kvantitativno različitu inervaciju, i to ne samo od strane eferentnog, već i od aferentnog dijela živčanog sustava. Za ovakvu organizaciju postoji čitav niz dobro ilustriranih primjera koji su doveli do teorije 'kemijskog kodiranja' tj. korelacije specifičnih kombinacija neuroaktivnih tvari i precizno definirane projekcije/funkcije skupina neurona [20] [21] [22] [23]. Ovaj dio projekta ima dva glavna cilja; dokazati da različita ciljna tkiva/dijelovi srca primaju osobitu osjetnu inervaciju, te uspostaviti jasnu sliku nociceptivne inervacije za različite segmente srca. Posebno je važna nociceptivna inervacija prednje stijenke klijetki koja korelira sa irigacionim područjem distalnog dijela prednje interventrikularne arterije, područja miokarda važnog u pokusima sa 'ishemijskim protokolima'.

Cilj protokola 2 je izrada 'inervacijskih teritorija' tj. područja spinalne osjetne inervacije koja su u vezi s određenim ganglijima. Unatoč njihovoj preciznosti, injekcije retrogradnih boja u funkcionalno-definirana područja srca ne dovode do bojanja svih neurona spinalnih ganglija koji se projiciraju u tu regiju. Stoga se injiciranjem ganglija s najvećim brojem projekcija u srce može postići obojenje cjelokupne populacije živčanih završetaka dotičnog ganglija i tako utvrditi ne samo gustoću inervacije, već i međusobni omjer funkcionalno različitih završetaka koji potječu iz određenog spinalnog ganglija. Ovo saznanje je od osobite važnosti za planiranje tretmana kronične kardijalne boli.

Cilj protokola 3 je testiranje pretpostavke da akutne i kronične ishemijske 'ozljede' srca dovode do vrlo specifičnih promjena

inervacije (uključujući i osjetnu inervaciju) koje se manifestiraju na tri načina: promjenom ukupnog broja osjetnih neurona koji se projiciraju u ishemičnu regiju, promjenom oblika i kompleksnosti pripadajućih perifernih živčanih završetaka, te promjenom kvantitativnih odnosa između različitih neurokemijskih skupina s mogućnošću dominacije određene podskupine. Tu nas ponajviše zanima 'ponašanje' neurona koji sadržavaju CGRP zbog uloge ovog neuropeptida u vazodilataciji koronarnih arterija i ishemijskom prekondicioniranju miokarda.

Ciljevi protokola 4 i 5 su praćenje i opis promjena u inervaciji (posebice nociceptivnoj) u dva stanja za koje je dokazano da dovode do kvalitativnih i kvantitativnih promjena percepcije boli u ishemijskim stanjima srčanog mišića.

9.4 Primjena istraživanja (2 500 znakova):

Rezultati naših istraživanja imati će nekoliko važnih praktičnih primjena:

1. Uspostavljanje originalnih i specifičnih neurokemijskih karakteristika visceralnih 'srčanih' nociceptora omogućava njihovo prepoznavanje u skupini spinalnih aferentnih neurona i čini ih potencijalnim ciljnim stanicama farmakoloških intervencija. Mogućnost stimulacije ili blokiranja određenih neuroaktivnih supstancija (ili još bolje određenih originalnih kombinacija neuroaktivnih tvari) specifičnih za funkcionalno-definirane skupine osjetnih neurona može se u bliskoj budućnosti pokazati vrlo efikasnim pristupom u liječenju inoperabilnih i/ili refraktornih anginoznih napada.
2. Otkrivanje i razumijevanje specifične lokalizacije i distribucije peptidergičkih osjetnih neurona i njihove lokalizacije u spinalnim ganglijima će omogućiti preciznije pristupe liječenju inoperabilnih i/ili refraktornih anginoznih napada stimulacijom leđne moždine i/ili spinalnih ganglija. Ovi terapijski pristupi inače predstavljaju sigurnu dodatnu opciju u liječenju kronične anginozne boli, jer osim anti-nociceptivnog imaju dokazan i anti-ishemijski efekt [24]. Iako se relativno malo zna o točnom mehanizmu djelovanja stimulacije leđne moždine, pretpostavlja se da je oslobađanje CGRP i Substance P iz aferentnih živčanih završetaka (!) glavni uzrok navedenom blagotvornom učinku stimulacije, pa je stoga točno identificiranje ganglija s najvećim brojem peptidergičkih neurona važno za precizno postavljanje elektroda stimulatora.
3. Razumijevanje promjena koje nastaju u 'srčanim' spinalnim osjetnim neuronima kod šećerne bolesti i kod normalnog procesa starenja će pridonijeti razotkrivanju morfološke podloge fenomena 'nijeme srčane ishemije', što će u konačnici voditi do uspostave novih (sigurno osjetljivijih) kriterija u dijagnostici ishemijske bolesti srca, posebice kod ovih stanja.
4. Naši pilot-pokusi sugeriraju vrlo značajne kvantitativne i kvalitativne promjene svih populacija živčanih završetaka u miokardu klijetki vezanih za proces starenja. Naročito je zanimljiv trend relativnog porasta broja perivaskularnih aferentnih živčanih završetaka, pogotovo kad se promatra u svjetlu generalnog pada ukupnog broja svih završetaka (naši neobjavljeni podaci). Objašnjenje ove pojave i usporedba s trendovima u ishemiji i šećernoj bolesti dovesti će do boljeg razumijevanja uloge peptidergičke inervacije srca kao i (vjerojatno) proširenja uloge koju tradicionalno vezujemo uz osjetnu inervaciju visceralnih organa.

9.5 Očekivani rezultati (1 000 znakova za svaku godinu):

- 9.5.1 **Nakon 1. godine:** Prva godina će biti 'godina retrogradnih neuralnih bojanja' i izrade 'ganglijskih neuralnih mapa'. Populacije spinalnih osjetnih neurona koji inerviraju funkcionalno i topografski različite djelove srca će se prikazati i klasificirati prema veličini i lokalizaciji u specifičnim spinalnim ganglijima. Uz ovo, retrogradno obojeni neuroni će se podijeliti na osnovi jedinstvenih kombinacija neuroaktivnih tvari, a ove kombinacije će se koristiti kao 'markeri' za otkrivanje njihovih funkcionalnih osobitosti. Spajanjem triju skupina informacija (neurokemijsko kodiranje, morfološke karakteristike i specifične neuronske projekcije) omogućiti će se izrada 'neuronskih mapa' osjetne inervacije za različite djelove srca (SA čvor, perivaskularni subepikardijum oko prednje interventrikularne grane lijeve koronarne arterije te miokard različitih dijelova predklijetki i klijetki).
- 9.5.2 **Nakon 2. godine:** Druga godina će biti 'godina anterogradnih neuralnih bojanja' i izrade 'srčanih neuralnih mapa'. Dizajn pokusa koji će se izvoditi u drugoj godini donekle ovisi o rezultatima pokusa prve godine, jer će se njima otkriti tj. locirati 'glavni' spinalni gangliji za osjetnu inervaciju pojedinih djelova srca. Ti gangliji će se injicirati anterogradnim neuralnim bojama što će rezultirati mogućnošću izrade preciznih 'srčanih neuralnih mapa' nakon što se analiziraju srčani rezovi s pregledom srčanih struktura. Slični pokusi rezultirali su lociranjem preciznih vagalnih aferentnih projekcija (neurona iz nodoznog ganglija) u miokardu pretklijetki štakora [25] [26]. Nakon 'mapiranja' živčanih završetaka, rezovi će se obraditi imunohistokemijski pa će se formirati podskupine živčanih završetaka na osnovi specifičnih kombinacija neuroaktivnih tvari. Kolidiranjem podataka o lokalizaciji i neurokemijskim karakteristikama živčanih završetaka moći će se zaključiti o njihovoj funkciji.
- 9.5.3 **Nakon 3. godine:** Treća godina je 'godina akutne i kronične ishemije miokarda'. Kako se radi o neizravnoj 'traumi' perifernih živčanih završetaka, naime ishemijom je pogođen miokard i živčani završeci bi trebali zadržati normalan kapacitet provođenja akcijskih potencijala, rezultati utjecaja ishemije na osjetne završetke biti će posebno zanimljivi. Uspoređujući inervaciju normalnog i ishemičnog miokarda kod iste životinje, dobit će mo jasnu sliku morfološke podloge koja vodi prilagodbi osjetnog živčanog sustava na ishemijske promjene miokarda. Mišljenja o načinu reakcije osjetnih živaca na ishemiju variraju, od teorije izravne i neizravne aktivacije svih spinalnih aferentnih neurona, do postojanja specifičnih 'ishemijskih nociceptora' [12] [9]. Naši rezultati će pridonijeti razjašnjenju tih dilema, a što je vjerojatno još važnije, pokazati će imaju li peptidergički nociceptivni neuroni

aktivnu ulogu u prilagodbi miokarda i/ili koronarnih arterija na ishemiju.

- 9.5.4 **Nakon 4. godine:** Četvrta godina će biti 'godina dijabetičkog modela'. Podaci iz literature govore o tome da šećerna bolest uzrokovana streptozotocinom dovodi do izrazite autonomne neuropatije koja zahvaća sve dijelove autonomnog živčanog sustava koji opskrbljuje srce sa izraženim znakovima degeneracije neurona [27]. Utjecaj ovih degenerativnih promjena na peptidergičke neurone i njihove živčane završetke nije do sada istražen. Našim pokusima opisati će mo specifične promjene u spinalnim osjetnim neuronima koji se projiciraju u miokard klijetki (broj, gustoća, smještaj peptidergičkih živčanih završetaka) kao i promjene u neuronima spinalnih ganglija (broj i neurokemijske karakteristike) koji se projiciraju u stijenke klijetki. Očekuje se da će pad broja neurona i promjene neurokemijskih trendova biti u izravnoj svezi s duljinom trajanja i težinom šećerne bolesti a ovi rezultati će se usporediti i s nalazima na modelu starenja.
- 9.5.5 **Nakon 5. godine:** Peta godina će biti 'godina modela starenja'. Rezultati naših pilot studija praćenja trendova inervacije stijenke klijetki kod 'starog' štakora (25 mjeseci), i usporedbe s istim kod mladog (2 mjeseca starosti) i 'zrelog' (6 mjeseci starosti) štakora pokazuju jako zanimljiv trend porasta gustoće živčanih završetaka imunoreaktivnih na SP i CGRP, naročito u području subepikarda u okruženju koronarnih arterija malog kalibra. Ovaj nalaz će biti proširen i nadopunjen pokusima retrogradnog bojanja neurona koji se projiciraju u miokard i u perivaskularni subendokard. Kombiniranjem imunohistokemijskih markera objasniti će mo pravi karakter ovog 'rasta' broja osjetnih živčanih završetaka koji se suprostavlja trendu ukupnog pada gustoće inervacije miokarda a koji se bilježi u starosti.

10.0 SADAŠNJE STANJE, DOPRINOS I OSPOSOBLJENOST SURADNIKA

10.1 Dosadašnje spoznaje (2 500 znakova):

Sažetak relevantnih prijašnjih otkrića je izložen u drugom dijelu ovog prijedloga projekta kao pozadina za razvoj hipoteza na kojima se projekt bazira. Središnja uloga koju spinalni gangliji imaju u transmisiji i modulaciji ishemijske boli [10] i velika zastupljenost spinalnih aferentnih neurona u inervaciji miokarda klijetki [7] glavni je razlog promjene fokusa našeg zanimanja s područja intrinzičke inervacije srca na osjetnu. Zašto su peptidergički neuroni koji sadržavaju CGRP i SP toliko zanimljivi? Postoji mogućnost da ovi neuroni imaju dvostruku ulogu, ulogu nociceptivnih receptora i ulogu modulatora vaskularne aktivnosti koronarnih arterija. Ili se pak radi o dvije različite populacije neurona? CGRP/SP je kao kombinacija neuropeptida marker osjetnih neurona koji inerviraju miokard štakora i zamorca [15] [28]. U elektrofiziološkim studijama utvrđeno je da spinalni neuroni koji sadržavaju CGRP imaju svojstva tipičnih kožnih nociceptora [29]. Nalaz da primarni osjetni neuroni, posebice oni koji su osjetljivi na capsaicin, u štakorskom srcu imaju veoma važnu modulatornu ulogu (posebice je važan njihov utjecaj na tonus koronarne vaskulature) [30] je važan za potpuno razumijevanje uloge peptidergičkih aferentnih projekcija. Demonstrirano je da osjetna vlakna koja, kad su stimulirana oslobađaju SP i CGRP, prisutna u velikoj količini u perivaskularnim živčanim spletovima [3] a isti su autori pokazali da CGRP ima snažan vazodilatacijski efekt, dok SP ne djeluje na vaskularni tonus. Nedavno utvrđeni blagotvorni efekti elektrostimulacije grudnog segmenta leđne moždine na smanjenje ili otklanjanje boli u miokardijalnoj ishemiji pripisuju se efektu CGRP na koronarne žile [4] [31]. Prema tome čini se da bi peptidergički aferentni živčani završeci mogli imati i dodatnu ulogu uz ulogu transmisije nociceptivnih podražaja. Postavlja se pitanje je li postoje dvije odvojene populacije neurona koji sadržavaju CGRP i SP neuropeptide? Ili čak postoje tri podskupine, koje sadržavaju samo CGRP, samo SP i neuroni sa kolokalizacijom ovih dvaju neuropeptida? Kako promjene stanja srca u ishemiji, šećernoj bolesti i starosti utječu na ove podskupine neurona? Izgleda da postojeća literatura nudi više pitanja nego odgovora!

10.2 Nastavak prethodnih istraživanja (2 500 znakova):

Ovaj prijedlog projekta je logičan nastavak i značajno proširenje studija inervacije srca koji su se odvijali pod mojim mentorstvom kroz protekle 3 godine. Znanstveni interes moje istraživačke skupine na Zavodu za anatomiju i staničnu biologiju Sveučilišta u Melbourne-u bio je usmjeren na probleme razumijevanja morfoloških značajki periferne i središnje živčane opskrbe i regulacije srčane funkcije. Prema najjednostavnijem shvaćanju, periferne komponente živčanog sustava koji opskrbljuju srce imaju samo provodnu ulogu [32]. Prema novijim postavkama koje se temelje na velikom broju objavljenih radova, periferni segment živčanog sustava koji opskrbljuje srce ima sposobnost autonomne lokalne regulacije te može funkcionirati i bez utjecaja središnjeg živčevlja. Randall sa suradnicima je ovaj koncept nazvao koncept 'srčanog mozga' [33]. Ovaj koncept i njegove postavke ni danas nisu ništa manje aktualni. Aktivnosti mog laboratorija bile su usmjerene primjeni ovog koncepta na štakorski model. Nedavno objavljeni radovi imaju za temu koncept organizacije intrinzičkih neurona u srcu a prikazuju i novu metodu pripreme tkiva za imunohistokemijske postupke [34]. Neurokemijske karakteristike i konkretni primjeri 'kemijskog kodiranja' intrinzičkih lokalnih neurona kao i ekstrinzičke autonomne inervacije detaljno su prikazani u dvije publikacije u kojima je prvi autor moj donedavni PhD kandidat [34] [35]. Retrogradna neuralna bojanja uz metode multiple imunohistokemije na razini konfokalnog mikroskopa upotrebljeni su da bi se opisala organizacija ganglijskih simpatičkih neurona koji se iz stelatnog ganglija projiciraju u miokard lijeve srčane klijetke [36]. Također, u prošloj godini je objavljen rad koji opisuje originalnu metodu retrogradnog bojanja intrinzičnih i ekstrinzičkih neurona srca [19] a daje i kritički prikaz mogućih problema krive interpretacije bojanja (što je čest slučaj). Završena je i posebna studija (trenutno u fazi pisanja rada) koja se bavi kvalitativnom i kvantitativnom analizom utjecaja starenja na simpatičke, parasimpatičke i osjetne živčane završetke u miokardu štakorskih klijetki. Gore navedeni objavljeni radovi i količina prikupljenih podataka (i iskustava) stvaraju vrlo solidnu osnovu za daljnji rad, a glavni razlog promjene središta zanimanja sa područja intrinzičke inervacije srca na osjetnu inervaciju je objašnjen u prethodnom poglavlju ovog prijedloga projekta.

10.3 Odjek i utjecaj (citati, primjene, patent) prethodnih istraživanja (2 500 znakova):

Pet znanstvenih radova koji su u izravnoj svezi sa ovim prijedlogom projekta (od strane članova i/ili suradnika u mom bivšem laboratoriju) su publicirani u respektabilnim znanstvenim časopisima (Clin Exp Pharmacol Physiol and Cell Tissue Res) [19, 34-37] a dva članka pod naslovima: 'Investigation of the intrinsic circuits in the rat and guinea pig heart' i 'Innervation of the rat ventricular myocardium: patterns of sympathetic, parasympathetic and sensory supply related to ageing' su u završnim fazama pripreme za publiciranje i biti će poslani na recenziju po završetku ovog prijedloga projekta. Ove publikacije su rezultat intenzivnog rada (kroz protekle 3 godine) na vrlo složenoj temi inervacije srca. Budući da je većina radova novog datuma (pa je nemoguće ocijeniti njihov čimbenik utjecaja) dvije 'starije' publikacije: Anderson ('98) i Richardson et al (2003) su do danas citirane 9 i 11 puta. Važnost ovog istraživačkog područja najbolje ilustrira činjenica da je unutar sekcije za Kliničku Neuroznanost američkog Nacionalnog Instituta za Zdravlje (National Institute of Health) nedavno osnovana posebna sekcija za kliničku neurokardiologiju ('Clinical Neurocardiology Section') te da je neurokardiologija priznata kao znanstvena i klinička disciplina te da se posebni tečajevi iz ove discipline redovito nude kliničarima: (pogledati: http://www.training.nih.gov/onlineapps/trainingprograms/applications/CLITP_AdList.aspx?AdID=TP-9). Postoje još dva dodatna čimbenika u svezi utjecaja kojeg ovaj prijedlog projekta ima. To su lokalna i međunarodna znanstvena suradnja kao i utjecaj na promociju važnosti neuroznanosti. Aktivna suradnja (u smislu razmjene iskustava i gostovanja) s istraživačkom grupom Profesora Anderson-a na Zavodu za anatomiju i staničnu biologiju Sveučilišta u

Melbourne-u nastaviti će se nesmanjenim intenzitetom. Uspostaviti će se i nova suradnja s istraživačkim grupama koje se bave bazičnom neurokardiologijom u Europi i Kanadi/Americi. Naša je želja postati referalnim centrom za bazičnu neurokardiologiju na području Republike Hrvatske.

I konačno, velike prenosti suradnje u okviru zajedničkog programa realizirati će se u obliku dijeljenja zajedničke opreme i specifičnih iskustava, a da je to realno očekivati govori i iskustvo suradnje pretočeno u zajedničku publikaciju sa grupom profesora Sapunara [38].

10.4 Uključenost znanstvenih novaka u istraživanje i mjere za osamostaljenje mladih suradnika na projektu (10 000 znakova):

Kao što je razvidno iz mog životopisa , ja, Ivica Grković, glavni istraživač na ovom prijedlogu projekta nedavno sam se trajno vratio u Hrvatsku nakon 12 godina provedenih na Zavodu za anatomiju i staničnu biologiju Sveučilišta u Melbourne-u. U toj instituciji radio sam u akademskom naslovu 'Senior Lecturer'. Ovaj prijedlog projekta je moj prvijenac u Hrvatskoj (isprika zbog lošeg hrvatkog jezika) a nalazim se na početku formiranja vlastitog laboratorija i svoje istraživačke grupe. Uz znatnu količinu laboratorijske opreme koju sam uspio donijeti mogao sam osigurati samo kratke posjete svojih dojučerašnjih suradnika i što se osoblja tiče tu sam na početku. Oboje asistenata na katedri na kojoj sam pročelnik (dr Čavar i dr Agnić) su izrazili iskreno zanimanje za rad na ovom projektu i spremni su započeti čim projekt zaživi. Dva su razloga zbog kojih uz odobrenje ovog prijedloga projekta tražim dva znanstvena novaka; veliki obim i kompleksnos projekta kao i činjenica da oboje mladih kolega imaju velike nastavne obveze koje će ih spriječiti u potpunom angažmanu u ovom projektu. Kao što sam već spomenuo, nastavit ću i proširiti već postojeću (pogotovo međunarodnu suradnju, što će stvoriti prilike za slanje novaka i suradnika na kratke ili duže radne boravke na respektabilnim znanstvenim institucijama. Inače, imam iskustva organizacije međunarodnih stručnih razmjena. Dok sam radio na Sveučilištu u Melbourne-u bio sam jedan od inicijatora i koordinator suradnje između Ministarstva Zdravstva Republike Hrvatske i Sveučilišne Klinike za Urgentnu Medicinu u Melbourne-u. Suradnja je dovela do organizacije kratkog studija za urgentnu medicinu i boravka dviju skupina zdravstvenih radnika iz Hrvatske na izobrazbi u 2003. godini.

10.5 Popis do 30 najvažnijih znanstvenih radova svih suradnika na projektu objavljenih u posljednjih 5 godina (350 znakova):

10.5.1	Barker, P.J., Guggenheimer, K.T., Grkovic, I., Briggs, C.A., Jones, D.C., Thomas, C.D., Hodges, P.W. (2006) Effects of tensioning the lumbar fasciae on segmental stiffness during flexion and extension. (Young Investigator Award winner). Spine Vol.15;31(4), 397-405
10.5.2	Richardson, R.J., Grkovic, I., Allen, A.M., Anderson C.R. (2006) Separate neurochemical classes of sympathetic postganglionic neurons project to the ventricle of the rat heart. Cell Tissue Res. Vol. 324(1), 9-16
10.5.3	Richardson, R.J., Grkovic, I., Anderson C.R. (2005) Cocaine and amphetamine related transcript peptide and somatostatin in rat intracardiac ganglia. Cell Tissue Res. Vol. 324(1), 17-24
10.5.4	Sapunar, D., Modric-Jednacak, K., Grkovic, I., Michalkiewicz, M., Hogan, G.H. (2005) Effect of peripheral axotomy on pain-related behavior and dorsal root ganglion neurons excitability in NPY transgenic rats. Brain Res. Vol.1063(1), 48-58
10.5.5	Grkovic, I., Fernandez, K., McAllen R.M., Anderson C.R. (2005) Misidentification of cardiac vagal pre-ganglionic neurons after injections of retrograde tracer into the pericardial space in the rat. Cell Tissue Res. Vol. 321(3), 335-340
10.5.6	Grkovic, I. (2005) Transition of the medical curriculum from classical to integrated: problem-based approach and Australian way of keeping academia in medicine. Croat Med J. Vol. 46 (1), 16-20
10.5.7	Richardson, R.J., Grkovic, I., Anderson, C.R. (2003) Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. Vol. 314, 337-350
10.5.8	Liu, D.Y., Martic, M., Jobson, S., Grkovic, I., C. Garrett, C., Dunlop, M.E., Baker, H.W.G. (2002) Phorbol myristate induces ruffling of the acrosome of human sperm. Fertility and Sterility. Vol 78, No.1, 128-36
10.5.9	Liu, D.Y., Martic, M., Clarke, G.N., Grkovic, I., Garrett, C., Dunlop, M.E., Baker, H.W.G. (2002) An anti-actin monoclonal antibody inhibits the zona pelucida induced acrosome reaction and hyperactivated motility of human sperm. Mol. Hum. Reprod. Vol. 8 (1), 37-47
10.5.10	Portbury, A.L., Grkovic, I., Young, H.M., Furness, J.B. (2001) Relationship between post-synaptic NK1 receptor distribution and nerve terminals innervating myenteric neurons in the guinea-pig ileum. Anat. Rec. Vol. 263, 248-254
10.5.11	
10.5.12	
10.5.13	
10.5.14	

10.5.15	
10.5.16	
10.5.17	
10.5.18	
10.5.19	
10.5.20	
10.5.21	
10.5.22	
10.5.23	
10.5.24	
10.5.25	
10.5.26	
10.5.27	
10.5.28	
10.5.29	
10.5.30	

NAPOMENA

11.1 **Napomena i popis priloga (5 000 znakova):**

Prilog 1 sadrži popis literature korišten u pripremi prijedloga projekta.
 Prilog 2 sadrži pisma podrške suradnika A/professor Colin Anderson, Department of Anatomy and Cell Biology, University of Melbourne, Parkville, 3010, Australia.
 Prilog 3 sadrži potvrde Etičkog povjerenstva medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

SUGLASNOST VODITELJA PROJEKTA

Suglasnost voditelja projekta o odgovornoj provedbi istraživanja i znanstvenoj čestitosti

MZOŠ će u svrhu raspodjele sredstava za financiranje razmatrati samo one prijave istraživanja/projekta sukladne najvišim međunarodnim standardima osobne i institucionalne odgovorne provedbe istraživanja i znanstvene čestitosti te usklađene s pozitivnim propisima Republike Hrvatske.

Za provedbu i usklađenost jamče čelnik ustanove i voditelj projekta sukladno zaključenom Ugovoru o radu na znanstvenom projektu s Ministarstvom znanosti, obrazovanja i športa, te voditelj projekta potpisom Obrasca za prijavu znanstvenih projekata i dokumenta o Suglasnosti voditelja projekta.

Odgovorno provedenim istraživanjem smatra se ono istraživanje koje obuhvaća sve nabrojene kriterije znanstvene čestitosti, kolegijalnosti, zaštite ispitanika, zaštite i brige o pokusnim životinjama, čestitosti prema ustanovi i društvene odgovornosti.

1) **Znanstvena čestitost**

- a. Svi suradnici na projektu stručni su u polju istraživanja, što je valjano potkrijepljeno odgovarajućim dokazima (referencama i životopisom), a čiju istinitost i valjanost svojim potpisom jamči voditelj projekta.
- b. Prava na rezultate istraživanja, intelektualna, vlasnička i druga prava u iznosu, odnosno relativnom odnosu u kojem Ministarstvo financira, odnosno sudjeluje u financiranju projekta, regulirati će se Ugovorom o radu na znanstvenom projektu.
- c. Sva obradba podataka proizašlih iz istraživanja ispravna je i u skladu sa znanstvenom metodologijom. Statistička obradba podataka čini se isključivo korištenjem primjerenih i najstrožih kriterija i testova.
- d. Prikazani rezultati istraživanja u bilo kojem obliku dosljedno odgovaraju provedenim istraživanjima, te niti u najmanjem obliku ne postoji izmišljanje, popravljavanje ili plagiranje podataka, rezultata, ideja, postupaka ili riječi u postupcima predlaganja, provođenja, revizije ili prikazivanja istraživanja. Prijava istraživanja u svojoj ideji i cilju istraživanja jest originalno djelo te niti u jednom dijelu ne sadrži neovlašteno prisvajanje tuđih ideja, podataka, rezultata i riječi.
- e. Znanstvenim izvješćima proizašlim iz istraživanja/projekta smatrat će samo originalna autorska djela u neposrednoj svezi s istraživanjem, što isključuje i sve oblike nepravilnog znanstvenog ponašanja, kao što su samoplagiranje i dvostruke publikacije.

2) **Kolegijalnost**

- a. Autori i koautori svih znanstvenih izvješća i publikacija proizašlih iz projekta/istraživanja zadovoljavaju navedene kriterije: (a) razvoj ideje istraživanja s bitnim učešćem u izradbi koncepta i oblika istraživanja; i (b) prikupljanje, obradba ili tumačenje rezultata istraživanja; i (c) pisanje i oblikovanje znanstvenog izvješća i publikacije ili kritička revizija i konačno odobrenje znanstvenog izvješća i publikacije. Autor treba zadovoljiti bar jedan uvjet iz svake kategorije a, b i c.
- b. Razmjena informacija i uporaba opreme koja je javno financirana slobodna je.
- c. Mentorski odnosi proizašli iz projekta/istraživanja s obvezama nadređenih i podređenih počivaju na međusobnom uvažavanju i dogovoru o intelektualnom vlasništvu nad rezultatima, postupcima, patentima i sl.

3) **Zaštita ispitanika**

Svako istraživanje/projekt odobreno je od odgovarajućih tijela – Etičkih povjerenstava ustanove ili sl. – gdje se zahtijeva pridržavanje odgovarajućim međunarodnim i lokalnim zakonima, pravilnicima i naputcima o zaštiti ispitanika. Povrh odobrenja nadležnih etičkih povjerenstava, kojih potvrđnicu s potpisom i pečatom ustanove treba obvezatno priložiti uz otisnuti primjerak prijave projekta, voditelj projekta/istraživanja ovom suglasnošću jamči:

- a. dragovoljno sudjelovanje svih ispitanika;
- b. pristanak informiranog ispitanika (od engl. *informed consent*);
- c. povjerljivost, tajnost i anonimnost podataka o ispitanicima; te
- d. povoljan omjera boljitka/rizika (od engl. *cost/benefit*) za ispitanike.

4) **Zaštita/briga o pokusnim životinjama**

Ukoliko su u istraživanje/projekt uključene pokusne životinje, voditelj projekta jamči striktno pridržavanje Zakonu o dobrobiti životinja te izrijekom opisuje i potvrđuje pridržavanje Zakonu uza svu relevantnu dokumentaciju o postupcima, protokolima, ustanovi, uzgojnim nastambama, načinu i kvalificiranosti održavanja živih pokusnih životinja i potvrde nadležnih ustanova (etičko povjerenstvo, nadležni veterinar i sl.).

5) **Čestitost u odnosu prema ustanovi**

Voditelj projekta svojim potpisom jamči:

- a. nepostojanje financijskog i vlasničkog sukoba interesa i nepostojanje sukoba interesa spram matične ustanove;
- b. nepostojanje sukoba lojalnosti/privrženosti matičnoj ustanovi pri provođenju istraživanja/projekta, te nepostojanje istraživanja za privatnu ili javnu ustanovu kojih je opseg veći od opsega redovitog posla ili u potpunosti sprječava obavljanje redovitog posla;
- c. poznavanje pravila/naputaka/statuta ustanove unutar koje se predlaže provođenje istraživanja.

6) Društvena odgovornost

Voditelj projekta svojim potpisom prihvaća društvenu odgovornost te:

- a. predlaže istraživanja/projekte koji su od društvenog značaja/prioriteta;
- b. jamči pridržavanje najvišim ekološkim normama, te prilaže detaljan opis utjecaja na okoliš (i društvo) kao i načine zbrinjavanja toksičnog i drugog otpada nastalog tijekom istraživanja;
- c. jamči da su svi postupci i rabljena tvoriva u istraživanju/projektu sukladni pozitivnim propisima Republike Hrvatske.

Ja, **Ivica Grković**, voditelj projekta razumijem sve napatke, obveze i odgovornosti povezane uz javno financiranje predloženog projekta te se obvezujem provoditi predloženo istraživanje/projekt pridržavajući se najviših profesionalnih standarda, od kojih su tek neki gore navedeni, kao i svih pozitivnih legislativa, pravilnika i napatka vezanih uz područje i polje, kao i subjekte/objekte ovdje navedenih istraživanja. Svojim potpisom potvrđujem da sam pročitao, razumio te da sam suglasan sa svime navedenim, te da je predloženo istraživanje/projekt sukladno navedenim obvezama, dužnostima i odgovornostima koje pod punom moralnom, materijalnom i kaznenom odgovornošću i preuzimam.

Potpis voditelja projekta:**Privitak:**

1. Vlastoručno potpisani životopis (*Curriculum Vitae*) u formatu Europske zajednice za voditelja projekta i za sve suradnike i znanstvene novake prijavljene na projektu.
2. Potvrdnica nadležnog Etičkog povjerenstva, s potpisom i pečatom ustanove.