

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Identification and functional characterization of (eco)toxicologically relevant polyspecific membrane transport proteins in zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	
Trajanje projekta	3.5 god (42 mjeseca)	
Ključne riječi (najviše do 5)	Zebrafish, polyspecific transporters, identification, molecular characterization, (eco)toxicological relevance	
	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).	Temeljna identifikacija i molekularna (funkcionalna) karakterizacija polispecifičnih membranskih transportnih proteina koji imaju potencijalno ključnu ulogu u zaštiti stanice (organizma) od stranih, potencijalno toksičnih tvari (ksenobiotika).	
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).	Novo znanje o ključnim (eko)toksikološki relevantnim transportnim proteinima omogućit će: (1) vjerodostojniju upotrebu zebrice (<i>Danio rerio</i>) kao modela u biomedicinskim istraživanjima; (2) razumijevanje interakcije između ključnih elemenata stanične detoksikacije i okolišnih zagađivala; (3) razvoj i primjenu brzih i reproducibilnih <i>in vitro</i> metoda za određivanje interakcije između važnih transportnih proteina i lijekova ili zagađivala.	
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Riba vrste zebrica (<i>Danio rerio</i>), 250-300 odraslih jedinki.	
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Očekivani negativni učinci uslijed izlaganja embrija i/ili odraslih jedinki (divljih jedinki i genskih <i>knock-outa</i>) modelnim toksičnim tvarima kreću se od mogućih razvojnih malformacija, fenotipskih promjena i promjena u ponašanju, sve do letalnih učinaka.	
Primjena načela 3R		
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Intenzivno korištenje <i>in vitro</i> metoda predviđeno je projektom. Finalna verifikacija uloge istraživanih proteina predviđena je u drugom dijelu projekta i nije ju moguće obaviti bez pokusa na životinjama, što uključuje <i>in vivo</i> istraživanja/pokuse na genskim <i>knock-outima</i> i kontrolnim (divljim) jedinkama. Pri tome je sam smisao projekta korištenje zebrice kao suvremenog i sve intenzivnije korištenog kralješničkog modela umjesto tradicionalnih istraživanja na glodavcima.	
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj životinja koje će se koristiti u istraživanju minimizirat će se maksimalnom eksploatacijom rezultata <i>in vitro</i> istraživanja, te stupnjevitima optimiziranjem dizajna pokusa koji će uključivati minimalne koncentracije modelnih tvari, minimalan broj jedinki po pokusnoj skupini, te u konačni minimalno ponavljanje pokusa u svrhu konačne verifikacije učinka.	
3. Pобољшanje 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	Zebrica (<i>Danio rerio</i>) je jedinsteni model među kralješnjacima koji dozvoljava učinkovito istraživanje promjena fenotipa u odgovoru na genske promjene. Brojne prednosti (mala veličina, brojno potomstvo, krako generacijsko vrijeme, optička prozirnost embrija, mogućnost brzih genetičkih i kemijskih pretraživanja) omogućavaju primjenu zebrice u praćenju i modeliranju ponašanja stanice pri razvoju, odnosno formiranju organa kralješnjaka, na način koji ne dozvoljava	

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

životinje.	niti jedan drugi istraživački model kralješnjaka. Raspoloživost tisuća različitih genskih mutanti i transgenih linija je također vitalni resurs koji je na raspolaganju istraživačima, a brojni protokoli za molekularno biološke metode, toksikološka pretraživanja na širokoj skali, kao i tehnike funkcionalne genomike razvijene su upravo za korištenje zebrice kao istraživačkog modela. S obzirom na ciljane istraživanja transportnih proteina, osim opisanih detaljnih <i>in vitro</i> istraživanja funkcionalna važnost odabranih proteina nužno treba biti verificirana <i>in vivo</i>, pri čemu je demonstriranje funkcije u genskim <i>knock-outima</i>, tipično miševima, tradiciolani „zlatni standard“ u području. Međutim, jasno je da niz karakteristika biologije glodavaca, pa tako i miševa, onemogućava njihovo široko korištenje u opsežnim genetičkim pretraživanjima. Nadalje, za ovaj projekt važno je napomenuti da EU direktiva 2010_63 izričito uključuje frazu "<i>independently feeding larval forms</i>" kao ključni kriterij pri odlučivanju kada se pokusi sa slobodno živućim embrijima i ličinkama moraju klasificirati kao pokusi sa životinjama. Kao što je to preporučeno od strane <i>European zebrafish community</i> (više od 330 neovisnih istraživačkih grupa u 30 zemalja), prema tom kriteriju samo zebrice nakon 120 h poslije fertilizacije trebaju biti predmet regulacije u okviru <i>European animal protection guidelines</i>. Stoga se zebrica u biti ne smatra laboratorijskom životinjom prema relevantnoj EU direktivi, i taj istraživački model u potpunosti je sukladan s deklariranim 3R principima.
------------	--