

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi																										
Trajanje projekta	01.09.2015. do 01.09.2019.																										
Ključne riječi (najviše do 5)	lipidne splavi, gangliozidi, živčani sustav, inhibitori glikolipida, stres, epigenetika																										
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika): Cilj istraživanja je dokazati da je sastav lipidnih splavi narušen kod genetički izmijenjenih miševa s nedostatkom sinteze određenih gangliozida pod utjecajem stresa i procesa starenja. Na temelju navedenog bi se postavili temelji za farmakološku manipulaciju lipidnih splavi. U svrhu dokazivanja postavljene hipoteze pratiti će se promjene u sastavu lipidnih splavi te će se napraviti analiza transkriptoma središnjeg i perifernog živčanog sustava kod genetički izmijenjenih miševa i štakora s nedostatkom sinteze određenih gangliozida pod utjecajem kroničnog stresa i procesa starenja. Molekule, inhibitori ključnih enzima u metabolizmu glikolipida, koje bi mogle poslužiti u farmakološkim intervencijama sintetizirati će se i dalje sistematizirati prema učinku na sastav lipidnih splavi u kulturama živčanih stanica i na mišjem modelu. Kombinacijom lipidomičkog i transkriptomičkog pristupa će se odabrati kritični signalni put koji će se proučiti detaljno do epigenetskih promjena. Genetički, ekološki i farmakološki inducirane promjene u sastavu lipidnih splavi će dati uvid u njihovu funkciju i omogućiti će razvoj lijekova vezanih za poremećaje tijekom stresa i za poboljšanje regeneracije. <table border="1"> <tr> <td>Temeljno istraživanje</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Translacijska i primijenjena istraživanja</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Očuvanje vrste</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Visoko obrazovanje ili osposobljavanje</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Forenzička ispitivanja</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima</td><td>da</td><td>ne</td></tr> </table>			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
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).	Tema studije uključuje istraživanje utjecaja promjena sastava gangliozida u lipidnim splavima staničnih membrana živčanog sustava na signalne mehanizme uključene u diferencijaciju stanica i odgovor na stres. Promjene sastava gangliozida su početni znak neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimer i Parkinson, ali je mehanizam ovih promjena još uvijek nepoznat i ne postoje lijekovi koji djeluju na ovom mjestu. Cilj projekta je analizirati lipidom i transkriptom već konstruirana 4 miša sa isključenim genima za sintezu gangliozida, načiniti mapu promjena u lipidnim splavima do kojih dovodi kronični stres u perifernom i živčanom sustavu, sintetizirati molekularne inhibitore enzima za sintezu gangliozida, testirati ih na																										

	staničnom modelu i konačno testirati na mišjem modelu.
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>).	Predložene studije će omogućiti bolji uvid i razumijevanje mehanizama koji reguliraju održavanje lipidnih splavi kao mjesta započinjanja ključnih fizioloških signalnih procesa. Mapiranje promjena nakon genetičke ili farmakološke manipulacije tehnikama transkriptomike i lipidomike doprinijet će boljem razumijevanju uloge lipidnih splavi u procesima kao što su stresni odgovor, neurodegeneracija, apoptoza i diferencijacija te omogućiti razvoj potencijalnih lijekova za ove procese.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Štakori: Sprague-Dawley – 128 štakora Miševi: Beta-1,4-N-Acetyl-Galactosaminyl Transferase 1 (<i>B4Galnt1</i>) "knock out" - 96 miševa ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1 (<i>St8sia1</i>) "knock out" - 96 miševa ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3 (<i>St3gal3</i>) "knock out" - 96 miševa "knock out" za Gaucherovu bolest – 96 miševa C57BL/6 – 256 miševa
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U prvoj godini pokusa izvodi se studija kroničnog i "sham" stres na štakorskom modelu. Sham skupina životinja prolazi "sham stres" koji uključuje samo okoliš istovjetan pokusu u kroničnoj skupini no sam stresor je isključen. Može se zaključiti kako sham skupina nije anksiozna te se pokus može razvrstati kao blag. Zatim prema težini slijedi kronična skupina u kojoj se stres provodi kroz 3 niza ponavljanja pokusa. Između svakog niza postoji stanka od 2 tjedna u kojoj se životinje oporavljaju. Sami stresori ne uzrokuju fizičku bol životinjama te se taj dio pokusa može smatrati blagim no zbog ponavljanja 3 niza pokusa koji mogu uzrokovati psihološku patnju smatramo ga umjerenim. Paralelno sa stresom provodi se bihevioralna studija koja se može karakterizirati blagom. S obzirom da pokus zahtijeva ovariektomiju te kastraciju na 32 životinje (u potpunoj anesteziji i uz postoperativnu njegu) radi ovog postupka težina ukupnog pokusa u prvoj godini može se razvrstati kao umjerena. U prvoj godini studije se također nabavljaju, uzgajaju i žrtvuju (u potpunoj anesteziji) 'knock out' modeli miševa i pripadajuće kontrole u svrhu stvaranja banke tkiva za studiju lipidomike i transkriptomike. U drugoj i trećoj godini nastavlja se prikupljanje tkiva i organa 'knock out' i kontrolnih životinja za analizu lipidnih splavi. Nastoji se sakupiti po 8 životinja iz svakog razvojnog stadija. S obzirom da se životinje prije žrtvovanja ne izlažu nikakvom

	štetnom utjecaju cjelokupan pokus u drugoj i trećoj godini može se razvrstati kao blag. Istovremeno teku pokusi na staničnim kulturama i ispituje se učinkovitost i toksičnost sintetiziranih inhibitora sinteze gangliozida. U drugoj, trećoj i četvrtoj godini životinje se izlažu djelovanju 4 odabrana derivata inhibitora enzima za sintezu gangliozida koje ćemo sintetizirati po uzoru na već poznatu supstancu D-PDMP (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) inhibitor glukozilceramid sitaze. Zlatni standard tretiranja u ovu svrhu je davanje životinjama već poznate substance D-PDMP, od koje je nastao lijek za Gaucherovu bolest. Kako ova supstanca ne povećava smrtnost životinja i ne izaziva patnju, a naši inhibitori će prvo biti testirane in vitro i odabrani po kriteriju minimalne toksičnosti, zaključujemo kako se zbog toga pokus može razvrstati kao blagi do umjereni.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Kako se radi o sistemskoj studiji koja prati promjene u različitim strukturama živčanog sustava (hipokampus kao model struktura za Alzheimer; bazalni gangliji – Parkinson; nadbubrežna žlijezda - stres) model je nemoguće u cijelosti zamijeniti istraživanjima koja ne uključuju pokusne životinje. Drugi dio studije je sinteza i testiranje potencijalne aktivne tvari koja se može primijeniti kod neurodegeneracije i regeneracije. Tek nakon ispitivanja na kulturi stanica, odabiru se 4 najprikladnija derivata koja se kasnije primjenjuju na miševima. Primjena na miševima nužna je zbog izolacije lipidnih splavi iz različitih organa i tkiva i testiranja neškodljivosti na životinjskom na sistemskom modelu što je nemoguće učiniti na kulturama stanica.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pokusu je planiran najmanji mogući broj životinja s maksimalnim iskorištenjem uzoraka, s obzirom na količinu raspoloživog tkiva. Minimalan broj životinja za pokus određen je statističkim metodama te se u svakoj skupini nalazi 8 životinja.
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.	Sprague Dawley štakori predstavljaju model na kojemu je rađen najveći broj sličnih studija stresa pa se naša studija može usporediti s prethodnima. Odabrani soj miševa i njegove 4 'knock-out' izvedenice (<i>B4Galnt1</i>, <i>St8sia1</i>, <i>St3gal3</i> i Gaucher model) nužni su za bolju uvid u posljedice enzimskih defekata koji mijenjaju sastav lipidnih domena i signalnih procesa na membrani te se studija ne može izvesti u <i>in vitro</i> uvjetima. U pokusu životinje ne trpe fizičku bol. Pri žrtvovanju se vrši anestezija te životinja pri uzimanju uzoraka nije svjesna i ne osjeća bol, strah niti patnju. Štete za životinje, osobito 'knock-out' modele, smanjuju se obogaćivanjem okoliša prikladnim igračkama (ovisno o soju miša te negativnim učincima koji se kod svakoga ispoljavaju),

	kućicama, tuljcima. Kako bi se izbjegla fizička bol pri zahvatim i žrtvovanju koristi se slijedeća anestezija i analgezija: Opća anestezija: ketamin hidroklorid (Ketanest®) 40 -100 mg/kg i.p. i ksilazin (Xylapan®) 15 mg/kg i.p./ Sevofluran (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Great Britain) kao inhalacijska anestezija kod kirirškog zahvata.
--	---