

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Uloga fosfoinozitida u nastanku trombocita		
Trajanje projekta	01.01.2016. – 31.12.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	trombociti, megakariociti, fosfoinoziditi, trombopoeza, protrombociti		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):		
	Temeljno istraživanje	da	
	Translacijska i primijenjena istraživanja		ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja		ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje		ne
	Očuvanje vrste		ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje		ne
	Forenzička ispitivanja		ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima		ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Trombociti su najmanje stanice naše krvi čiji je glavni zadatak prepoznavanje oštećenja krvnih žila, a posreduju i u procesima različitih bolesti uključujući upale, metastaze, ateroskleroze. Trombociti nastaju iz prekursorskih stanica megakariocita u koštanoj srži gdje diferenciraju u procesu megakariopoeze iz hematopoetskih matičnih stanica. Megakariociti nadalje prolaze proces sazrijevanja koji uključuje endomitozu, intenzivnu sintezu proteina, lipida, te stvaranje unutrašnje mreže membrana potrebnih za nastanak novih trombocita. U posljednjoj fazi razvoja zrelog megakariocita (trombopoeza), megakariociti prolaze kroz intenzivne promjene citoskeleta, te stvaraju protrombocite – važnu intermedijarnu strukturu razvoja megakariocita, a sadrži razgranate citoplazmatske produžetke sa sferičnim proširenjima koji će na kraju otpuštati pojedinačne trombocite. Molekularni mehanizmi koji reguliraju citoplazmatske promjene megakariocita u protrombocite u velikoj mjeri su nepoznati. Predloženi projekt istražuje ulogu lipidne molekule, fosfatidilinozitol 3-monofosfata (PI3P) u nastanku megakariocita i protrombocita. U stanicama PI3P se nalazi u ranim endosomima i sudjeluje u endosomalnom prometu. Naša je hipoteza da membranski promet reguliran PI3P-om u endocitnom putu znatno pridonosi biogenezi trombocita. U istraživanju ćemo koristiti genetski napravljene fluorescentne probe, tehniku koja se temelji na proteinskim domenama fuzioniranim s fluorescentnim proteinom eksprimiranim s retrovirusa, kako bi odredili lokalizaciju i funkciju različitih fosfoinozitida u megakariocitima i protrombocitima. Upotrebom dobro definiranih staničnih modela megakariocita iz miše fetalne jetre ili koštane srži, istražiti ćemo kako interferencija PI3P funkcije utječe na sazrijevanje megakariocita u svim njegovim razvojnim fazama. Osim toga, identificirat ćemo ključne proteine koji vežu PI3P regulirajući membransku dinamiku važnu za stvaranje protrombocita.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti	Trombocitopenija (smanjeni broj trombocita), te stoga povećan rizik od krvarenja vrlo su česta pojava u hematološkim malignim bolestima, u kemoterapiji, radioterapiji, te kod trauma. Jedina		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

<i>unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).</i>	terapija bolesnika u takvim stanjima su transfuzije trombocitima, a čija dostupnost ovisi o broju dobrovoljnih davatelja krvi. Zadnjih godina korištenje koncentrata trombocita je u porastu u klinici, te je jedan od glavnih izazova osiguravanje njihove dovoljne količine. Razvijanje alternativnih načina modulacije broja trombocita odnosno alternativnih izvora produkcije trombocita neovisnih o davateljima krvi uvelike ovisi o poznavanju molekularnih mehanizama koji reguliraju razvoj trombocita. U ovom projektu istražiti ćemo ulogu lipidne molekule PI3P, te doprinos endosomalno-lizosomalnog puta u razvoju megakariocita i trombocita. Ovo istraživanje će doprinijeti našem razumijevanju osnovnih molekularnih procesa nastanka trombocita koji bi mogli doprinijeti novim terapijskim strategijama u dobivanju trombocita ili liječenju trombocitopenija.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti laboratorijski miševi. Približan broj miševa koji se planiraju koristiti u istraživanju tijekom 3 godine je 550.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	U ovom istraživanju životinje će biti žrtvovane cervikalnom dislokacijom u svrhu uzimanja embrija iz trudnih mišica, ili kostiju femura i tibije radi daljnje pripreme staničnih kultura. Kod pojedinih životinja uzimat će se krv iz retroorbitalnog pleksusa, u svrhu izolacije trombocita, te će životinje prethodno biti podvrgnute anesteziji. Zbog korištenja anestezije u skladu sa pravilima veterinarske stuke životinje neće trpjeti bol. Moguća je prolazna blaga nelagoda neposredno nakon injekcije, pa će se životinje pratiti nakon injiciranja. Očekivana razina težine postupka je blaga.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Životinje će se koristiti s obzirom da ne postoji alternativna metoda za istraživanje različitih razvojnih stadija megakariocita u trombocite. Dostupni modeli staničnih linija zbog svojih karakteristika ne mogu zamijeniti primarne stanice razvijene iz laboratorijskih životinja. Ne postoje stanični modeli koji bi mogli zamijeniti trombocite iz periferne krvi, te je trombocite nemoguće kultivirati u staničnoj kulturi. Kako je svrha projekta ispitati molekularne mehanizme koji utječu osobito na zadnji stadij razvoja megakariocita, odnosno stvaranje protrombocita, u pokusima ćemo koristiti dobro definiran i razvijen mišji model megakariocita dobivenih iz fetalne jetre i koštane srži, te će se koristiti trombociti izolirani iz mišje krvi.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U pokusima će se koristiti najmanji mogući broj životinja potreban za dobivanje statistički relevantnih podataka, te ćemo organizirati pokuse na način da je informacija dobivena iz svakog miša maksimalna. Kako bi REDUCIRALI broj miševa, koristit ćemo iste miševe za izolaciju koštane srži i uzimanje krvi.
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli	

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Primarne stanične kulture dobivene iz tkiva životinja imaju svojstva koja nije moguće reproducirati korištenjem staničnih linija. Miševi su često korišteni i dobro karakteriziran model za izučavanje trombocita i razvoja megakariocita. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga. Životinjama će tijekom pokusa biti praćeni znakovi nelagode ili stresa te će u slučaju istih životinje biti žrtvovane na human način. Općenito, očekuje se da će životinje osjetiti samo BLAGU nelagodu te će biti žrtvovane ako prerastu tu razinu.
---	--