

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Presenilin 2 - zaštitnik od Alzheimerove bolesti		
Trajanje projekta	01.05.2015. - 31.12.2016.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Alzheimerova bolest, bolest Niemann-Pick tipa C (NPC), presenilin 2		
	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).	Cilj projekta je utvrditi ulogu proteina presenilina 2 u zaštiti protiv nastanka Alzheimerove bolesti i istražiti molekularne mehanizme odgovorne za ovaj učinak.		
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).	Ovaj projekt će doprinijeti razumijevanju funkcije presenilina 2 – ključnog proteina u nastanku peptida Abeta odgovornog za patogenezu Alzheimerove bolesti te će nastojati razotkriti njegovu novu funkciju u protekciji protiv nastanka ove teške, neizlječive bolesti. Korištenje primarnih kultura neurona hipokampusa, korteksa i cerebeluma kao i tkiva ovih moždanih regija nužno je za utvrđivanje <i>bona fide</i> uloge ovog proteina u funkciji mozga i zaštiti od neurodegeneracije. Naime, hipokampus predstavlja primarno mjesto nakupljanja peptida Abeta i pojave neurodegeneracije u Alzheimerovoj bolesti, dok se u kasnijim stadijima bolest širi na korteks. U cerebelumu, međutim, u kojem je protein presenilin 2 najizraženije eksprimiran, ove promjene se uglavnom ne događaju. Stoga su primarne kulture hipokampusa, korteksa i cerebeluma, kao i moždana tkiva ovih regija, najrelevantniji model za određivanje protektivne uloge presenilina 2 u nastanku Alzheimerove bolesti.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Očekuje se da će se koristiti 12 ženki genotipa $NPCI^{+/-}$ i 5 mužjaka genotipa $NPCI^{+/-}$ za dobivanje oko 12 gravidnih mišica genotipa $NPCI^{+/-}$ iz kojih će se na dan graviditeta 16-18 (E16-E18) izolirati mozgovi fetusa za uspostavljanje primarnih kultura neurona hipokampusa i korteksa genotipa $NPCI^{+/+}$, $NPCI^{+/-}$ i $NPCI^{-/-}$. Nadalje, očekuje se da će se koristiti dodatnih 6 ženki genotipa $NPCI^{+/-}$, sa gore navedenim mužjacima genotipa $NPCI^{+/-}$, u skladu sa četvrtim „R“, za dobivanje tek rođenih miševa (P0-P1), za generiranje primarnih kultura Purkinje neurona cerebeluma. Ovih 6 ženki genotipa $NPCI^{+/-}$ će se koristiti dva puta za generiranje tek rođenih miševa. Ukupan broj odraslih životinja iznositi će 23. Približan broj embrija i tek rođenih životinja očekuje se oko 120 (60 embrija i 60 tek rođenih životinja). Za dobivanje po 9 miševa svakog $NPCI$ genotipa ($NPCI^{+/+}$, $NPCI^{+/-}$ i $NPCI^{-/-}$) i starosti 4, 7 i 9 tjedana očekuje se da će se koristiti ukupno 81 životinja.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje će biti usmrćene dislokacijom vrata. Fetus (E16-E18) i tek rođene životinje (P0-P1) će biti dekapitirani. Nepovratan tip pokusa.		
Primjena načela 3R			
1. Zamjena	1. Zamjena - Tijekom ovog projekta, koristit ćemo se metodama koje		

Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	djelomično izbjegavaju korištenje miševa (ili nekih drugih životinja). Ove zamjenske metode predstavljaju <i>in vitro</i> ili stanične modele humanih bolesti kao što su Niemann-Pick tip C (NPC) i Alzheimerova bolest. To su: a) NPC1^{-/-} stanice, koje predstavljaju stanice ovarija kineskog hrčka [engl. Chinese Hamster Ovary (CHO)] u kojima je <i>NPC1</i> gen u potpunosti izbrisan, i b) SH-SY5Y stanice, koje predstavljaju stanice neuroblastoma u kojima se humana, živčana izoforma <i>APP</i> gena, APP695, stabilno i prekomjerno generira (takozvane SH-SY5Y/APP stanice), koje će biti podvrgnute tretmanu sa kemijskim spojem U18666A. Obje vrste gore navedenih stanica/tretmana će imitirati najznačajniji fenotip bolesti Niemann-Pick tip C što predstavlja nakupljanje kolesterola unutar stanica. Međutim, iako se početni ili preliminarni pokusi mogu izvršiti u stanicama izoliranim iz glodavaca (CHO stanice) ili u humanim, transformiranim stanicama koje posjeduju fenotip živčanog sustava (SH-SY5Y/APP stanice), ove stanice ne predstavljaju <i>bona fide</i> živčane stanice koje su najbitnije stanice za izučavanje neurodegenerativnih bolesti kao što su NPC i Alzheimerova bolest, a koje su u fokusu ovog projekta. Ovo je razlog zbog kojeg ćemo pored ovih zamjenskih metoda za izučavanje NPC i Alzheimerove bolesti koristiti primarne, živčane stanice izolirane iz miševa koji predstavljaju modele humanih bolesti NPC i Alzheimerove bolesti. Međutim, i ovaj <i>in vitro</i> model primarnih živčanih stanica iz miševa ne može u potpunosti replicirati patološke procese koji se odvijaju u određenim regijama mozga karakterističnim za bolest NPC i Alzheimerovu bolest, koje osim živčanih stanica sadrže stanice glia, astrocite, oligodendrocite, ekstracelularni matriks i dr. Stoga će biti neizbježno koristiti miševu i iz njih izolirati moždane regije korteksa, hipokampus i cerebeluma kako bismo pratili promjene patoloških procesa karakteristične za pojedine regije mozga u bolesti NPC i Alzheimerovoj bolesti.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	2. Smanjenje - Biološka varijabilnost je značajna odlika medicinskih istraživanja koja otežava mogućnost da se unaprijed može točno predvidjeti veličina uzorka koja je potrebna da se dobiju statistički relevantni rezultati i da se izbjegnu lažni i negativni zaključci. Svaki pokus bit će pažljivo planiran uključujući analiziranje statističke značajnosti svakog pokusa prije nego što se započne sa razmnožavanjem životinja. U tijeku ovog projekta, koristit ćemo prirodene vrste miševa (engl. <i>inbred</i>) umjesto genetički heterogenih vrsta (engl. <i>outbred</i>) zbog toga što će korištenje genetički homogenih, prirodnih miševa osigurati smanjenje ukupnog broja korištenih životinja budući da će manji broj genetički homogenih miševa osigurati statistički značajne rezultate. Također ćemo osigurati da prilikom svakog pokusa maksimum uzorka bude prikupljen od svake pojedinačne životinje/fetusa.
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.	3. Poboljšanje - Dobrobit životinja bit će zaštićena u svakom pogledu. Miševi će se držati u standardnim uvjetima za parenje, u socijalnim uvjetima primjerenim miševima. Pod kaveza će biti prekriven steljom koja im omogućava pravljenje gnijezda, a pristup hrani i vodi će biti <i>ad libitum</i>. Poštovat će se standardi boravišta u uvjetima od 12 h boravišta na svjetlu i 12 h boravišta u tami. Životinjama će biti patnja biti svedene na minimum jer u tijeku ovog projekta nisu planirani pokusi koji zahtijevaju kirurške zahvate, operacije niti bilo koji drugi testovi koji se izvršavaju na živim životinjama. Označavanje ušiju i rezanje repa koje će biti obavljeno u svrhu identificiranja životinja i njihove genotipizacije vršit će se na anestetiziranim životinjama