

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Matične stanice usne šupljine čovjeka za liječenje ishemijske bolesti mozga. ORASTEM		
Trajanje projekta	48 mjeseci		
Ključne riječi (najviše do 5)	matične stanice sluznice, transplantacija stanica, moždani udar, bioluminiscencija, MRI		
	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)	U ovom projektu ćemo istražiti terapijski potencijal ektodermalnih matičnih stanica ljudske sluznice usne šupljine za liječenje ishemijske bolesti mozga. U prvoj fazi ćemo istražiti kako se iz biopsije sluznice usne šupljine čovjeka mogu dobiti živčane stanice te kako takve stanice reagiraju na uvjete in vitro ishemije. U idućoj fazi projekta ćemo testirati terapijski potencijal tih stanica nakon transplantacije u mozak miša zahvaćen moždanim udarom.		
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)	Očekujemo da će matične stanice usne šupljine čovjeka zbog svojeg podrijetla, pozitivnih rezultata na modelima neurodegeneracije te naših obećavajućih preliminarnih rezultata biti efikasne u poticanju oporavka živčanog tkiva oštećenog ishemijom. Ukoliko se naša hipoteza potvrdi, ove će stanice zbog svoje dostupnosti, ektodermalnog podrijetla i terapijskog potencijala biti predložene kao stanice izbora u kliničkim pokusima na pacijentima oboljelima od moždanog udara.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Laboratorijski miševi sojeva: C57BL/6N, B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)6Jrs/J, C57BL/6-Tg(TTR2-Fluc, gfp)Kri, C57BL/6-Tg(GAP43-luc gfp)Kri Ukupno približno 180 životinja u periodu od 4 godine		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje kod kojih će se izazvati moždani udar ili će im se stereotaksijski transplantirati matične stanice doživljavaju negativne učinke samih postupaka – slabost udova jedne strane tijela i smanjenu pokretljivost. Ipak, takvo stanje ih nikada ne sprječava u hranjenju. Iz našeg višegodišnjeg iskustva znamo da preko 95% takvih životinja preživi i doživi oporavak. Pojedini miševi će biti eutanazirani u vremenskim točkama od 7 ili 30 dana po izazivanju moždanog udara ili lažne operacije za izolaciju tkiva.		
Primjena načela 3R			
1. Zamjena	Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća. Laboratorijski miš se koristi kao glavni životinjski model u istraživanjima fiziološke funkcije mozga te u terapijskim postupcima liječenja oštećenja mozga. Pri tom ne postoji alternativna metoda za in vivo istraživanje terapijskih postupaka liječenja oštećenja mozga. Model staničnih kultura nije dostatan za istraživanje kompleksnosti funkcije mozga u fiziološkim uvjetima, niti za mjerenje povezanosti i aktivnosti neurona u neuronskim krugovima pri patološkim zbivanjima.		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	Laboratorijski miš je malen te se njime jednostavno rukuje što ga čini posebno pogodnim za neinvazivne tehnike snimanja bioluminiscencijom i magnetskom rezonancijom (Kurt et al. ILAR J 2008). Planirani model ishemijskog moždanog udara začepljenjem srednje moždane arterije filamentom koji se uvodi kroz zajedničku karotidnu arteriju sve do središnje moždane arterije je primjer modela ishemijskog moždanog udara kod ljudi koji se najčešće upotrebljava u suvremenim istraživanjima (Belayeva I. et al. Brain Res 1999, Carmichael ST et al. Stroke 2008).
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Primjenom neinvazivnih tehnika snimanja (bioluminiscencija i magnetska rezonancija) omogućeno je opetovano snimanje istih životinja čime se značajno smanjuje broj životinja korištenih tijekom pokusa. Broj životinja koji će se koristiti u invazivnim pokusima izračunat je testovima za određivanje veličine uzorka u istraživanju za čije je izračunavanje potrebna: snaga testa (iznosi 80% za uobičajena biomedicinska istraživanja), razina značajnosti (iznosi 0.05%) te veličina učinka izračunata prema Cohenovoj formuli.
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.	Mišji model omogućava korištenje jednakih životinja u pokusima zbog visoke srođenosti sojeva te istraživanja na transgeničnim miševima koje se razlikuju samo u jednom genu. Mišji je genom sekvencioniran, miš pokazuje visoku homologiju s ljudima, visoku stopu reprodukcije te jednostavnost održavanja. U planiranom istraživanju očekivana razina težine postupaka je blaga, te će se u slučaju pojave boli, stresa ili nelagode životinje usmrtiti na humani način. Kod životinja koje će se koristiti u invazivnim pokusima javit će se umjerena bol. Svaka neugoda će biti spriječena operiranjem životinja u općoj anesteziji (2% izofluran) sa pre- i postoperativnim uklanjanjem boli korištenjem analgetika (Buprenorfin, 0.05 mg/kg). Također će se provoditi obogaćivanje kaveza koristeći skloništa ili materijala za pravljenje gnijezda.