

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Molekularni biljezi vulnerabilnosti, adaptacije i plastičnosti neurona u akutnoj i kroničnoj ozljedi mozga (NeuroReact)		
Trajanje projekta	48 mjeseci		
Ključne riječi (najviše do 5)	Vulnerabilnost neurona, mehanizmi adaptacije i plastičnosti neurona, ozljeda mozga, neurodegeneracija, molekularni biljezi		
	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 u kojoj mjeri su za selektivnu vulnerabilnost neurona odgovorni zajednički učinci ekspresije određenih proteina i njihovog lipidnog miljea, odnosno postoje li specifične promjene sastava i ekspresije membranskih glikolipida i proteina koje se mogu povezati s patogenezo neurodegeneracije u stanjima akutne i kronične ozljede mozga. Istraživanje je fokusirano na analizu neurona hipokampusa i malog mozga u stanjima hiperekscitabilnosti, hipoksične lezije i Alzheimerove bolesti. U istraživanju će biti korišteni uzorci ljudskog mozga, moždano tkivo mišjeg modela Alzheimerove bolesti i stanični model, čiji će specifični glikolipidomski profili biti povezani s rezultatima transkriptomске, proteomске, elektrofiziološke i morfološke analize.		
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).	U ovoj studiji usporedit ćemo ekspresiju izabranih molekularnih biljega (glikolipida i proteina), kao svojevrsni molekularni potpis neuronalnih populacija dviju regija mozga koje pokazuju različitu vulnerabilnost i odgovor na akutne i kronične lezije. Očekujemo da će istraživanje ne samo olakšati prepoznavanje specifičnih biljega vulnerabilnosti i adaptacije neurona već i pridonijeti daljnjim studijama koje bi potvrdile mogućnost moduliranja takvih molekula-biljega u svrhu uspješnije funkcionalne prilagodbe tkiva na ozljedu.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju će se koristiti transgenični mišji soj B6C3-Tg(APPswe,PS1 N1dE9)85Dbo/Mmjax, koji je prihvaćen i često korišten model neurodegeneracije u studijama Alzheimerove bolesti. Usporedno će se koristiti kontrolni divlji tip miseva C57BL/6. Svi miševi bit će nabavljeni od The Jackson Laboratory (JAX Mice). U istraživanje će biti uključeni miševi u dobi od 4 tjedna do 15 mjeseci, ukupno približno 96 životinja u razdoblju od 3 godine.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna i očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Očekivana težina postupaka s transgeničnim i kontrolnim životinjama tijekom istraživanja je blaga do umjerena. Istraživanje ne uključuje invazivne, kirurške eksperimentalne postupke. Jedini postupak kojem će biti podvrgnuti miševi in		

	<i>in vivo</i> je potpuno bezbolno snimanje mozga primjenom magnetske rezonancije. U svrhu provođenja znanstvenih ciljeva projekta, životinje se žrtvuju u određenim vremenskim točkama tijekom istraživanja, radi izolacije tkiva i organa i provođenja biokemijskih, molekularno-bioloških, imunohistokemijskih i morfoloških analiza. Transgenični APP/PSFEN1 miševi i kontrolni miševi bit će žrtvovani u dobi od 3, 6, 12 i 15 mjeseci, a nakon postupaka neuroanatomske disekcije, izolirane moždane regije bit će podvrgnute opsežnim analitičkim postupcima opisanim u prijavi znanstvenog projekta.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Ne postoji alternativna metoda koja bi osigurala istu pouzdanost rezultata s ciljem pretkliničkog <i>in vivo</i> istraživanja molekularnih biljega neuronalne vulnerabilnosti, pa se za ovakvo istraživanje moraju koristiti eksperimentalne životinje. Također, obzirom na složenu gradnju i funkcije mozga, modeli staničnih kultura ne mogu zamijeniti istraživanja patofizioloških procesa kod laboratorijskih životinja. Zbog etičkih razloga, slična istraživanja na humanoj populaciji su vrlo ograničena ili nisu moguća. Mišji modeli općenito omogućuju korištenje jednakih životinja u pokusima zbog visoke srodnosti sojeva. Mišji modeli Alzheimerove bolesti su vrlo zastupljeni u istraživanju mehanizama neurodegeneracije. Soj s kojim namjeravamo raditi u ovom istraživanju ubraja se među najčešće korištene modele pa će biti moguće s velikim stupnjem pouzdanosti i relevantno usporediti rezultate naših pokusa s onima objavljenima i prihvaćenima u znanstvenoj zajednici.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	Primjenom neinvazivnih tehnika snimanja moždanog tkiva <i>in vivo</i> omogućeno je opetovano snimanje istih životinja čime se značajno smanjuje broj životinja korištenih tijekom pokusa. Zbog potreba istraživanja, potrebno je uzeti različita tkiva ili organe, stoga će životinje biti usmrćene na detaljno opisani način (točka 4.1.1.1., Obrazac 2). Broj životinja koji će se koristiti u istraživanju izračunat je na temelju našeg dosadašnjeg eksperimentalnog iskustva u procjeni dovoljne količine materijala za provođenje točno određenih analitičkih postupaka. Također smo uzeli u obzir statističke testove za određivanje veličine uzorka u istraživanju pri čemu su uzeti u obzir. Prema navedenom, u našem istraživanju koristimo 12 životinja po svakoj dobnoj skupini (po 6 za histološke i imunohistokemijske metode, po 6 za biokemijske i molekularno-biološke metode), što je najmanji mogući broj životinja u grupi za potrebe pouzdanosti statističke analize i interpretacije rezultata. Anestezija će se koristiti za dvije vrste postupaka - prilikom žrtvovanja životinje ili za umirivanje životinje za potrebe provođenja snimanja mozga magnetskom rezonancijom.
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 životinje	Transgenični mišji model APP/PSFEN1 pogodan je za proučavanje patofiziologije Alzheimerove bolesti u kojoj su nepravilna razgradnja APP-a (amiloidni prekursorski protein) i posljedični depoziti amiloida jedan od glavnih patohistoloških nalaza. U transgeničnom APP/PSFEN1 mišu pokazano je da mutacije u genu za APP i za protein PSFEN1 koji sudjeluje u procesiranju APP djeluju sinergistički te ubrzavaju taloženje amiloida u mišjem središnjem živčanom sustavu. Najveća prednost korištenja transgeničnog mišjeg modela APP/PSFEN1