

Naslov projekta	Multidisciplinarna evaluacija razlike između kemijski inducirane te urođene (B4Galnt1-null) demijelinizacije u miša		
Trajanje projekta	01.04.2018.-01.10.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Kuprizon, demijelinizacija, B4Galnt1		
	Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika): Miševima B4Galnt1 nedostaje gen koji kodira enzim UDO-GalNAc:GM3/GD3-N-acetilgalaktozaminiltransferazu (GM2/GD2 sintaza). Radi toga B4Galnt1 miševima nedostaju složeni gangliozidi u mozgu – GD1a te GT1b koji se uobičajeno nalaze na aksonima neurona. Ukupna sinteza mijelina u tih je miševa vrlo slična miševima divljeg tipa. U nedostatku GD1a te GT1b gangliozida, glikoprotein vezan uz mijelin (eng. myelin-associated glycoprotein – MAG) koji čini glavnu sastavnicu mijelina više ne stvara odgovarajuće veze sa složenim gangliozidima na površini aksona. Takvi miševi starenjem pokazuju poremećaje aksonske degeneracije te demijelinizacije što se fenotipski uočava u obliku motoričkih i bihevioralnih nedostataka. Demijelinizacija inducirana kuprizonom (kao Sigma bis(cyclohexanone)oxalldihydrazone, kat. br: C9012, SAD) dobro je opisani model demijelinizacije središnjeg živčanog sustava. Terapija kuprizonom u miševa uzrokuje smrt oligodendrocita. Takve su promjene istraživane specijaliziranim tehnikama oslikavanja mozga – diffusion tensor imaging (DTI) te su uočene promjene u indeksu radijalne difuzije. Opisani mišji model B4Galnt1 do sada nije istraživan sličnim tehnikama oslikavanja mozga. U projektu će se izolirana tkiva mozga snimiti DTI sekvencom, a cilj je izračunati radijalnu difuziju u svrhu uočavanja razlika u demijelinizaciji između mišjeg modela inducirane demijelinizacije kuprizonom te B4Galnt1 mišjeg modela, kao i razlike koje se pojavljuju starenjem.		
	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 istraživanja je putem posebnih metoda snimanja magnetskom rezonancijom utvrditi koji se oblik demijelinizacije javlja kod životinja s utišanim genom B4Galnt1 u odnosu na životinje tretirane kuprizonom i životinje divljeg tipa (C57BL/6) koje nisu tretirane kuprizonom, te utvrditi dinamiku demijelinizacije kroz vrijeme. Cilj studije je razviti diferencijalno dijagnostičku tehniku magnetskog oslikavanja koja bi razlikovala metabolički izazvanu demijelinizaciju od one izazvane toksinima ili protutijelima.		
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).	Uz pomoć saznanja o B4Galnt1 genu i njegovu produktu moguće je razviti neinvazivnu, jeftinu i brzu dijagnostiku ljudi koji boluju od različitih demijelinizacijskih bolesti. Istraživanjem će se također razjasniti model koji opisuje demijelinizaciju kakva se vidi kod multiple skleroze, bolesti od koje danas u svijetu boluje više od 2 milijuna ljudi.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	C57BL/6 32 mužjaka, 16 životinja starosti 3 mjeseca te 16 životinja starosti 6 mjeseci B4Galnt1, 16 mužjaka, 8 životinja starosti 3 mjeseca te 8 životinja		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	starosti 6 mjeseci
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje koje se izlažu djelovanju kuprizona mogu razviti motoričke poteškoće, no ne i fizičku bol. Po završetku terapije kuprizonom životinje se podvrgavaju standardnim bihevioralnim testovima kao što su testovi eksplorativnog ponašanja, anksioznosti (activity cage) i pamćenja te se žrtvuju pri dostizanju određene dobi, kada se izoliraju potrebna tkiva i organi za lipidomsku i proteomsku analizu. S obzirom da su odabrani bihevioralni testovi blagog karaktera, a životinje se prije žrtvovanja ne izlažu nikakvom štetnom utjecaju cjelokupan pokus na 'knock-out' miševima te miševima divljeg tipa hranjenih hranom obogaćenom kuprizonom može se razvrstati kao težak dok se pokus na životinjama u kontrolnoj skupini može razvrstati kao blag. Radi toga predlažemo da se pokus ukupno razvrsta u kategoriju umjerenog pokusa.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Miševi predstavljaju model na kojemu je rađen najveći broj sličnih studija a odabrani sojevi miševa nužni su za bolju uvid u enzimске defekte koji mijenjaju sastav lipidnih domena te se studija ne može izvesti u <i>in vitro</i> uvjetima. Kako se radi o sistemskoj studiji koja je model za utjecaj gangliozida na održavanje, strukturne i fiziološke promjene lipidnih splavi u različitim strukturama centralnog i perifernog živčanog sustava model je nemoguće u cijelosti zamijeniti istraživanjima koja ne uključuju pokusne životinje. Primjena na miševima nužna je zbog izolacije lipidnih splavi iz različitih dijelova centralnog i perifernog živčanog sustava što je nemoguće učiniti na kulturama stanica.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj životinja određen je statističkim proračunom (test jakosti studije) te je uzet minimalan broj životinja po skupini kojim studija i dalje zadržava potrebnu statističku jakost prema referenci Principles of Laboratory Animal Science, editors LFM van Zutphen, V. Baumans, AC Beynen, Elsevier, 2001.
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.	Protokoli koji uključuju transgenični soj miša ne uključuje postupke koji uzrokuju bol i patnju životinja. Kod te skupine mogu nastati motoričke poteškoće uslijed njihova genotipa, a one se kompenziraju obogaćivanjem okoliša posebnim igračkama namijenjenima za tu svrhu. Dok ne dosegnu određenu starost pri kojoj se žrtvuju životinje su smještene u obogaćenom okolišu (tuljci za igru, kućice, papirići za izgradnju gnijezda) slobodnom od stresa. Dio protokola uključuje C57BL/6 miševе divljeg tipa. Oni će se također smjestiti u obogaćeni okoliš slobodan od stresa kao i miševi u prethodnom dijelu studije. Patnja se nadomješta uvođenjem igrački, kućica te ostalih sadržaja prikladnih za obogaćivanje okoliša. Taj dio pokusa nemoguće je predvidjeti i u potpunosti izbjeći jer je cilj studije utvrđivanje promjena u lipidnom splanima koje dovode do demijelinizacije i razvoj potencijalnih diferencijalno dijagnostičkih metoda za razlikovanje različitih tipova demijelinizacije. Štete za životinje smanjuju se korištenjem prilagođenih posudica za hranu i vodu koje se smještavaju u niži položaj kako bi se životinje s razvijenim motoričkim poteškoćama mogle neometano hraniti. Kako bi se izbjegla fizička bol pri zahvatima i žrtvovanju koristi se slijedeća anestezija i analgezija: ketamin hidroklorid (Ketanest®) 40 - 100 mg/kg i Isofluran (Forane® isofluranum, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Great Britain) kao inhalacijska anestezija.