

Naslov projekta	„Novel Bone Regeneration Drug “Osteogrow”: Therapeutic Solution for Lumbar Back Pain – OSTEOproSPINE“, Grant Agreement no. 779340, Horizon 2020.		
Trajanje projekta	2019. - 2022. god.		
Ključne riječi (najviše do 5)	spinalne fuzije kralježnice, rhBMP6, implantacije		
	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 (<i>na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe</i>).	Svrha pokusa je utvrditi učinkovitost različitih doza rhBMP6 proteina (Genera Istraživanja) u kombinaciji sa nekoliko vrsta koštanih supstitucijskih materijala (alograf i drugi kompresivno rezistentni materijali) i autolognim krvnim ugruškom nakon potkožne ugradnje. Pratit će se dinamika promjena nakon ugradnje u određenim vremenskim periodima kako bi se u potpunosti razjasnili svi biološki mehanizmi djelotvornosti ugrađenog nosača. Učinkovitost rhBMP6 proteina u životinjskim modelima kao i sigurnost njegove primjene kod životinja poznata je iz relevantne literature priložene u Obrascu 2.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Učinkovitost rekombinantnog humanog BMP6 (rhBMP6) proteina te praćenje dinamike stvaranje nove kosti u kombinaciji sa autolognim krvnim ugruškom i koštanim supstitucijskim materijalima je osnovni cilj jednog od navedenih pokusa na laboratorijskim živ u predkliničkim testovima efikasnosti. Za rhBMP6 nikada nije objavljena dinamika stvaranja novog koštanog tkiva koja bi u sebi uključivala sve korake slijeda događaja prisutnih u stvaranju nove kosti. Testiranja uzorkovanja vršit će se u više vremenskih intervala kako bi se histološki mogao pratiti svaki korak te objasniti učinak ABC kao i drugih koštanih		

	supstitucijskih materijala u cilju prevencije upale a stvaranja dobre i kvalitetne nove kosti. Navedena istraživanja će biti ne samo od koristi u smislu stvaranja novog koštanog lijeka za regeneraciju nego i u biološkom smislu će točno razjasniti kako faktor rasta djeluje ovisno o njegovoj dozi i odnosima drugih materijala u implantatu.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	748 laboratorijskih štakora
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Ne očekujemo neobjašnjive situacije ili iznenadna uginuća životinja tijekom provedbe postupaka do ciljanje eutanazije životinja zadnjeg dana pokusa. Smrtnost je rijetka osim u anesteziji izazvanoj uslijed individualnih bioloških varijacija što ne očekujemo.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Konzultiranjem literature alternativnih in vitro metoda nismo pronašli zamjenski metode na kojima bi se planirane studije provođenja pokusa izvodile (pristup bazi: 30.01.2019. AltWeb). S osvrtnom na potrebnu provedbu i težinu studije te očekivani učinak, uvijek slijedimo izračun najmanje potrebne veličine broja laboratorijskih životinja za kontrolne i pokusne skupine. Temeljem toga, u našem projektu predviđeno maksimalno zamjenjivanje („ <i>Replacement</i> “ u 3R) pokusa na životinjama modelima <i>in vitro</i> .
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	U slučajevima kada ne možemo izbjeći pokus na životinji, s visokom pažnjom planiramo pokuse tako da što više smanjimo („ <i>Reduction</i> “ u 3R) broj životinja u pojedinom pokusu i broj ukupnih pokusa na životinjama. Istraživanje je pomno planirano na najmanjem mogućem broju životinja, a da pri tome rezultati istraživanja ostanu statistički validni bez ugrožavanja ciljeva projekta.
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.	Opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinjama provodit će se postupcima poboljšanja stanja životinja tijekom pokusa (uklanjanje boli i tjeskobe): 1. Svakodnevno praćenje kliničkog stanja svih životinja prema skali boli, žrtvovanje u slučaju znakova teže patnje koji se ne očekuju s obzirom na provedeni postupak. Korištenje skale boli opisano je u točki 4.11.3. Planira se korištenje analgetika buprenorfina u dozi 0,05 mg/kg intraperitonealno svakih 12 sati prvih 48 sati. Ukoliko se pokaže da analgezija nije dovoljna prvo se planira smanjiti vremenski interval između dva davanja na 6 sati, a ukoliko ni to nije dovoljno povećat će

	se doza buprenorfina na 0,1 mg/kg intraperitonealno. Ukoliko se pokaže da je i nakon 48 sati prisutna bolnost produžit će se davanje analgetika buprenorfina dok god skala boli prikazuje prisutnost boli. Ukoliko nakon davanja buprenorfina, prema skali boli bude prisutna bolnost koristit će se meloksikam u dozi 0,5 mg/kg peroralno. 2. Životinje će u kavezima imati odgovarajuće okolišno obogaćenje uz poštivanje svih standarda rada sa životinjskim modelima i biti će smještane na dubokoj stelji (mekanoj prostirki) uz neometani pristup hrani i vodi <i>ad libitum</i>. Za vrijeme anestezije bit će primijenjena tekućinska terapija primjenom 1 ml/100 g tjelesne težine zagrijane fiziološke otopine. 3. Za vrijeme anestezije, zbog nemogućnosti treptanja kopcima bit će potrebno namazati rožnicu oftalmološkom masti. Ukoliko se kirurški zahvat produži po potrebi će se dodati ketamin u pola manjoj dozi nego na početku anestezije. Ukoliko se razvije hipotermija, životinja će biti grijana na toploj ploči za vrijeme i nakon anestezije. Kako bi se spriječio pad zasićenja hemoglobina kisikom životinjama će biti primijenjen kisik putem maske. 4. Kirurški zahvati izvodit će se primjenjujući pravila asepse i antiseptike (sterilni instrumenti za svaki kirurški zahvat, priprema operacijskog polja i ruku operatera, korištenje sterilnih kirurških prekrivki i dr.) kako bi se smanjila mogućnost nastanka infekcije. Infekcija može dovesti do nastanka sepsa i uginuća životinja. Osim što bi se povećao broj korištenih životinja, jer bi pojedine životinje uginule i trebalo bi ih zamijeniti novim životinjama, infekcija bi uzrokovala bol i patnju u bolesnih životinja. 5. Rukovanje- Životinjama treba pristupiti na miran i siguran način, izbjegavajući pretjerane ili iznenadne pokrete, kao što je naglo mahanje ruku, lupanje. Korištenje blagih niskih tonova i tihi glas pri razgovoru sa životinjama može ih upozoriti na pristup koji ih ne ugrožava i pojačati brižan stav u osobi koja skrbi o životinjama. Nadalje, izbor prikladne metode za prihvatanje, nošenje odnosno obuzdavanje životinje najvažniji je aspekt rukovanja. Metoda mora biti prikladna za određenu vrstu, sukladno preporukama (<i>Handbook on the Care and Management of Laboratory and other Research Animals</i>, 8th Edition, Wiley-
--	---

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	Blackwell), potrebno je uzeti u obzir i svaku vrstu ili pojedinačne razlike. Više anksiozni sojevi (što lab štakori nisu) mogu biti puno sporiji da bi se privikli na neke metode, zahtijevaju daljnju obuku i prilagodbu tehnika rukovanja, sve dok nisu mirne i naučile da rukovanje nije prijetnja. Također, mogućnost korištenja 'nižih' životinjskih vrsta kao što su laboratorijske vrste ribice (Zebrafish) ili vinska mušica (<i>Drosophilla melanogaster</i>) u našem slučaju nije realan odabir u postizanju rezultata potkožnog testa koji dokazujemo stvaranje ektopične kosti. Sve pokusne zahvate na životinjama smo temeljito metodološki proučili, pripremili i prilagodili („<i>Refinement</i>“ u 3R), tako da su maksimalno usmjereni na smanjivanje patnje životinja te uključenog broja životinja tijekom pokusa.
--	--