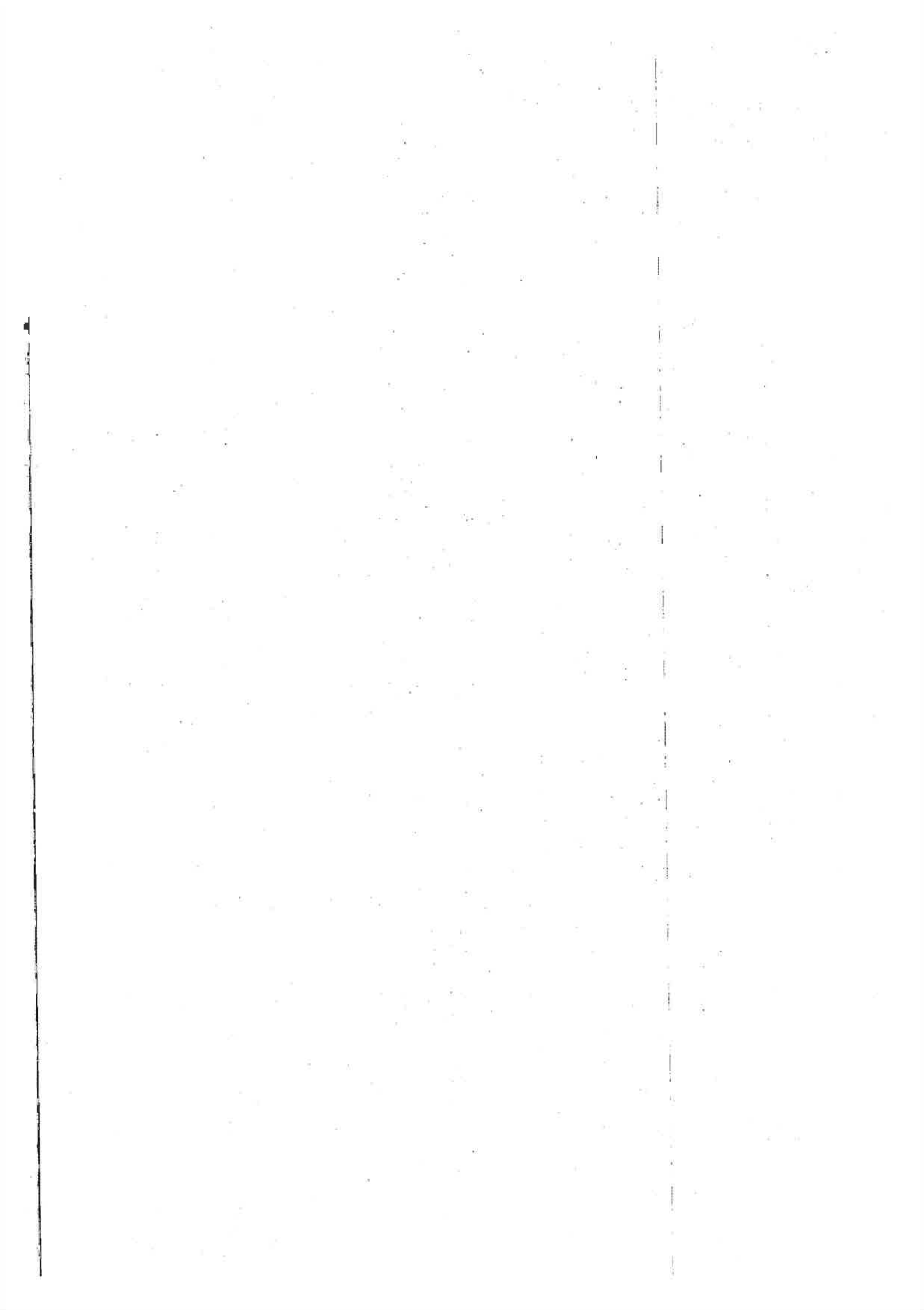


OBRAZAC 3

Naslov projekta	Uloga Fas-FasL apoptotskog puta u patogenezi mikro- i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti		
Trajanje projekta	1. lipnja 2019. do 30. svibnja 2024.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Diabetes mellitus; microvascular complications; macrovascular complications; Fas; FasL		
	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>).	Cilj je otkriti i rasvijetliti ulogu Fas apoptotskog puta u patogenezi razvoja mikro- i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti, kao što su: dijabetička nefropatija, retinopatija, encefalopatija i neuropatija, te dijabetička kardiomiopatija.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (<i>kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta</i>).	Saznanja koja bi se stekla ovim istraživanjem, doprinijeti će boljem razumijevanju navedenih komplikacija šećerne bolesti. Također, ova saznanja doprinijeti će u budućnosti i razvoju novih strategija u prevenciji i liječenju mikro- i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti, modulacijom navedenog puta.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Planira se koristiti ukupno 54 odraslih (12 tjedana starih) jedinki miša (<i>Mus musculus</i>) – od čega 18 soja C57BL/6; 18 sa isključenim genom za Fas receptor (B6.MRL-Fas ^{hr}) te 18 sa isključenim genom za Fas ligand (B6Smn.C3-FasL ^{ld}).		

U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Polovini miševa od svakoga soja (po 10 – ukupno 30), biti će izazvana šećerna bolest tipa 1, trostrukom aplikacijom otopine streptozotocina u razmaku od 1 dana (55 mg/kg); dok će kontrolnim miševima (8 od svakog soja, ukupno 24) istovremeno biti apliciran nosač (citratni pufer – placebo). Miševi će biti usmrćeni 30 dana nakon treće intraperitonealne aplikacije streptozotocina/citratnog pufera. U životinja u kojih se razvila šećerna bolest (očekivano 30 od ukupno 54, očekuje se razvoj poliurije, polidipsije i gubitka tjelesne težine. U kontrolne skupine životinja ne očekuje se nikakve promjene zdravstvenog statusa. I/p aplikacija miševima se smatra manjim zahvatom koji ne uzrokuje veći stupanj boli i tjeskobe. Sukladno Pravilniku, anestezija bi izazvala veću štetu od uboda iglom. Prilikom usmrćivanja, miševi će se prije potvrde usmrćivanja cervikalnom dislokacijom i susljednom dekapitacijom, anestezirati izofluranom. Životinje koje ne razviju dijabetes do 5. dana nakon zadnje aplikacije streptozotocina isključiti će se iz pokusa i eutanazirati kako je gore navedeno. Prije prve aplikacije te 1., 3. i 5. dana nakon aplikacije (ukupno 4 uzorkovanja), svim će životinjama biti izmjerena razina glukoze u krvi, pomoću glukometra, a iz kapljice krvi uzete iz repne vene. Sukladno NC3Rs, (https://www.nc3rs.org.uk/mouse-tail-vein-non-surgical), ubodom u jednu od repnih vena, sterilnim lancetarom. Sukladno Pravilniku, anestezija bi izazvala veću štetu od uboda iglom. <u>Razvrstavanje pokusa po težini.</u> Kategorija težine: umjerena za 30 životinja (dijabetični miševi) te blaga za 24 životinja (kontrolna skupina).
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Razvoj komplikacija šećerne bolesti složenog je tijeka, u kojem sudjeluje mnoštvo različitih čimbenika. Kao takav, ne može ga se adekvatno pratiti izoliranog u pojedinim staničnim kulturama, budući da na isti djeluje mnoštvo čimbenika iz samih stanica dotičnog organa, reakcija krvnih žila u samome organu, ali i ostatku organizma, čimbenici rasta i citokini koji se tvore u samom organu, ali i u drugim dijelovima organizma, promjena metaboličkog i hormonalnog statusa jedinke. Stoga je jedino njihovo promatranje u sustavu živog organizma svrsishodno i može dati relevantne informacije.

2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj životinja sveden je na najmanji koji je uobičajen u ovakvoj vrsti istraživanja, a da se ne ugrozi obstojnost rezultata (eventualno uginuće 2-3 životinje po skupini i dalje osigurava minimalni broj od 7-8 životinja za dobivanje statistički valjanih zaključaka). Prema podacima iz literature (Deeds et al., 2011; Tesh i Allen, 2007) oko 10% životinja ne razvije očekivani stupanj hiperglikemije nakon aplikacije streptozotocina te će te životinje biti isključene iz pokusa i eutanazirane. Minimalni broj od 7-8 životinja po skupini izračunat je temeljem podataka iz prethodnih studija za varijabilnost nekih od osnovnih varijabli koje će se mjeriti istraživanjem, a pomoću softvera za računanje veličine uzorka dostupnog na https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html. Kao jedna od osnovnih mjera fibrotičnih promjena u bubregu koristiti će se izražaj alfa glatkog aktina u glomerulima. Uz α-pogrešku 0,05 i očekivanu snagu studije 0,80, minimalna veličina uzorka bila bi 8 (ako se snaga studije poveća na 0,9 tada bi minimalni N iznosio 11). Stoga je broj životinja za kontrolnu skupinu sveden na 8. Nakon žrtvovanja životinja, osim ciljanih tkiva (mozak, jetra, bubreg, srce, oko), od žrtvovanih životinja uzeti će se uzorci najrazličitijih tkiva i organa te će biti pohranjeni u vidu banke tkiva i organa, a koje će onda poslužiti da bi zamijenila eventualne potrebe za ponavljanjem sličnih pokusa.
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.	Projekt koristi jedan od standardnih eksperimentalnih animalnih modela. Eksperimentalne tehnike se temelje na načelu poboljšanja tako da se moguća bol, patnja, tjeskoba ili trajno oštećenje uzrokovano životinjama ukloni ili smanji na najmanju moguću mjeru.. U kontrolne skupine životinja ne očekuje se nikakve promjene zdravstvenog statusa. U životinja u kojih se razvila šećerna bolest očekuje se razvoj poliurije, polidipsije i gubitka tjelesne težine. Ne očekuje se pojava bolova pa anestezija i analgezija ne bi bile produktivne (niti se koriste uobičajeno u ovoj vrsti pokusa). Životinjama će svakodnevno biti mijenjana stelja, kako bi stalno bile na čistom i suhom zbog poliurije. U kavezima će biti postavljene plastične kućice za miševe u svrhu obogaćivanja okoliša. Sa životinjama će se rukovati posebno pažljivo radi izbjegavanja stresa. Životinje će biti promatrane barem jednom dnevno. Postupke sa životinjama će provoditi/nadzirati adekvatno educirane osobe, s dugogodišnjim iskustvom u navedenim



Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	istraživanjima.
--	-----------------

