

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Stanična parabioza: uloga međustanične komunikacije u fenotipskoj supresiji (prijava na natječaj HRZZ IP-2019-04)		
Trajanje projekta	48 mjeseci, tentativno 1.01.2020. – 31.12.2024.		
Ključne riječi (najviše do 5)			
	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 ovog projekta je istražiti ulogu stanične parabioze, tj. međustanične komunikacije u supresiji fenotipa. Stanice unutar tkiva i organizama nisu homogene populacije, već su zbog različitih globalnih i lokalnih poremećaja heterogene, što često dovodi do razvoja aberantnog fenotipa u pojedinačnim stanicama. Ipak, organizmi su razvili sposobnost održavanja homeostaze relativno dugo vremena, manifestirajući tako latenciju pojave bolesti povezanih sa starosti. Naime, zdrava subpopulacija stanica može spriječiti pojavu aberantnog fenotipa u pojedinačnim stanicama i time omogućiti funkcionalnu homogenizaciju tkiva. Pojam "stanična parabioza" koristi se za označavanje ove fenotipske supresije stanične disfunkcije od strane nepromijenjenih zdravih stanica unutar populacije (Radman M. Open Biology 2019). Pretpostavljamo da se stanična parabioza oslanja na međustaničnu komunikaciju - skupu bioloških alata koji omogućuju koordinaciju pojedinih stanica unutar složenih višestaničnih organizama (Leontieva et al. PNAS 2014, Takeuchi et al. PNAS 2015., Puliafito et al. J R Soc Interface 2017). U ovom projektu želimo istražiti ulogu komunikacije između stanica neurona, između glia stanica (astrociti i mikroglija) i između stanica neurona i glia stanica u staničnoj parabiozi, tj. u svrhu supresije fenotipa te utvrditi mehanizme njihove međusobne komunikacije. U tu svrhu koristit ćemo neurone i glia stanice izolirane iz mišjeg modela rijetke neurodegenerativne bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC) i iz miševa divljeg tipa (wt).		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znunost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Za razliku od istraživanja koja imaju za cilj bolje razumijevanje neke pojedinačne bolesti i otkrivanje njenog molekularnog mehanizma, ovaj projekt želi otkriti temeljne komunikacijske puteve između pojedinih stanica mozga (neurona i glia stanica). Manipulacija ovih temeljnih komunikacijskih puteva (aktivacija ili inhibicija) može predstavljati novu, univerzalnu strategiju prevencije pa čak i liječenja rijetkih kao i brojnih čestih neurodegenerativnih bolesti.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Očekuje se da će se koristiti 24 ženki genotipa $NPC1^{+/+}$ i 12 mužjaka genotipa $NPC1^{+/+}$ za dobivanje oko 24 gravidne mišice genotipa $NPC1^{+/+}$. Dvanaest (12) gravidnih mišica genotipa $NPC1^{+/+}$ (4 gravidne ženke u triplikatu = 12) će se koristiti za dobivanje mladunaca postnatalnog dana 1 (P1) iz kojih će se izolirati mozgov (korteks) za uspostavljanje primarnih kultura kortikalnih neurona $NPC1^{+/+}$ u monokulturi i u ko-kulturi s neuronima i glia stanicama genotipa $NPC1^{+/+}$. Nadalje, očekuje se da će se koristiti dodatnih 12 ženki		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	genotipa $NPC1^{+/+}$, sa gore navedenim mužjacima genotipa $NPC1^{+/-}$, u skladu sa četvrtim „R“, za dobivanje mladunaca P1 iz kojih će se izolirati mozgov (korteks) za uspostavljanje primarnih kultura kortikalnih glija stanica (astrocita i mikroglija) $NPC1^{+/-}$ u monokulturi i u ko-kulturi s neuronima i glija stanicama genotipa $NPC1^{+/-}$. Ukupan broj odraslih životinja iznositi će 36. Približan broj P1 mladunaca očekuje se oko 144 (6 mladunaca po gravidnoj mišici).
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Mladunci postnatalnog dana 1 (P1) će biti dekapitirani, korteks će se izolirati za izradu primarnih kultura neurona i glija stanica u mono- i u ko-kulturi. Sve heterozigotne životinje koje više neće biti potrebno uključiti u pokus (tj. pariti) će se eutanizirati u komori ugljičnog dioksida. Očekivana je blaga razina težine postupka. $NPC1$ -heterozigotni miševi ($NPC1^{+/-}$) ne razvijaju fenotip bolesti NPC.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	1. Zamjena - Tijekom ovog projekta, koristit ćemo se metodama koje djelomično izbjegavaju korištenje miševa (ili nekih drugih životinja). Ove zamjenske metode predstavljaju <i>in vitro</i> ili stanične modele bolesti Niemann-Pick tip C (NPC). To su SH-SY5Y stanice, koje predstavljaju stanice humanog neuroblastoma, i humane mikroglija stanice HMC3 koje će biti podvrgnute tretmanu s kemijskim reagensom U18666A (najčešće korišten reagens za „oponašanje“ nakupljanja kolesterola u bolesti NPC). Ove stanice/tretman će imitirati najznačajniji fenotip bolesti Niemann-Pick tip C što predstavlja nakupljanje kolesterola unutar stanica i aktivaciju mikroglija. Međutim, iako se početni ili preliminarni pokusi mogu izvršiti u staničnim linijama humanih stanica neuroblastoma (SH-SY5Y) i humanih stanica mikroglija (HMC3), ove stanice ne predstavljaju <i>bona fide</i> živčane/glija stanice koje su najbitnije stanice za izučavanje neurodegeneracije i neuroinflamacije u bolesti NPC, a koja je u fokusu ovog projekta. Ovo je razlog zbog kojeg ćemo pored ove zamjenske metode za izučavanje NPC bolesti koristiti monokulture primarnih živčanih i glija (astrocite i mikroglija) stanica izoliranih iz miševa koji predstavljaju modele humane bolesti NPC. Međutim, ovi <i>in vitro</i> modeli primarnih mišjih živčanih i glija stanica u monokulturi ne mogu u potpunosti replicirati patološke procese koji se odvijaju u određenih regijama mozga karakterističnim za bolest NPC, koje osim živčanih stanica sadrže stanice glija, astrocite, mikroglija stanice, ekstracelularni matriks i dr. Stoga će biti neizbježno koristiti i ko-kulture stanica neurona i glija stanica.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	2. Smanjenje - Biološka varijabilnost je značajna odlika medicinskih istraživanja koja otežava mogućnost da se unaprijed može točno predvidjeti veličina uzorka koja je potrebna da se dobiju statistički relevantni rezultati i da se izbjegniju lažni i negativni zaključci. Svaki pokus bit će pažljivo planiran uključujući analiziranje statističke značajnosti svakog pokusa prije nego što se započne sa razmnožavanjem životinja. U tijeku ovog projekta, koristit ćemo prirodne vrste miševa (engl. <i>inbred</i>) umjesto genetički heterogenih vrsta (engl. <i>outbred</i>) zbog toga što će korištenje genetički homogenih, prirodnih miševa osigurati smanjenje ukupnog broja korištenih životinja budući da će manji broj genetički homogenih miševa osigurati statistički značajne rezultate. Također ćemo osigurati da prilikom svakog pokusa maksimum uzorka bude prikupljen od svake pojedinačne životinje/mladunca. Za utvrđivanje broja korištenih životinja korišten je <i>Russ Lenth's Power and Sample Size test</i> (http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/), a dobivene vrijednosti ćemo analizirati parametrijskim Student t-testom za neovisne uzorke (http://vassarstats.net).
3. Poboljšanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli	3. Poboljšanje - Dobrobit životinja bit će zaštićena u svakom pogledu. Miševi će se držati u standardnim uvjetima za parenje, u socijalnim uvjetima primjerenim miševima. Pod kaveza će biti

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	prekriven steljom koja im omogućava pravljenje gnijezda, a pristup hrani i vodi će biti <i>ad libitum</i> . Poštovat će se standardi boravišta u uvjetima od 12 h boravišta na svjetlu i 12 h boravišta u tami. Životinjama će bol i patnja biti svedene na minimum jer u tijeku ovog projekta nisu planirani pokusi koji zahtijevaju kirurške zahvate, operacije niti bilo koji drugi testovi koji se izvršavaju na živim životinjama. Dekapitacija i rezanje repa u mladunaca postnatalnog dana 1 (P1) će biti obavljena u svrhu izolacije korteksa i uspostavljanje primarnih kultura neurona i glija stanica te njihove genotipizacije.
--	---

