

OBRAZAC 3

Naslov projekta	The molecular links between lipidome, brain vulnerability and apolipoprotein E		
Trajanje projekta	1.09.2019. - 31.12.2021.		
Ključne riječi (najviše do 5)	lipidom, mozak, neurodegeneracija, neuroinflamacija, NPC1		
	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 ispitati ulogu lipida u različitoj osjetljivosti moždanih regija na neurodegeneraciju i/ili neuroinflamaciju. Ispitat ćemo hipotezu da je nakupljanje određenih lipida povezano s vulnerabilnosti moždane regije te s pojavom neurodegeneracije i/ili neuroinflamacije. Pri tom ćemo koristiti mišji model rijetke lizosomalne bolesti nakupljanja lipida Niemann-Pick tipa C (NPC).		
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).	Poremećeni metabolizam lipida i njihovo nakupljanje u mozgu uzrokuje nastanak oko 50-tak rijetkih nasljednih autosomno recesivnih bolesti nakupljanja lipida u lizosomima (engl. <i>lipid / lysosomal storage diseases</i>). U većini ovih bolesti karakteristična je pojava neurodegeneracije i neuroinflamacije ukazujući na važnu ulogu lipida za normalno funkcioniranje mozga. U ovom projektu ćemo analizirati promjene lipidoma u rijetkoj lizosomalnoj bolesti nakupljanja lipida Niemann-Pick tipa C (NPC). Cilj nam je utvrditi promjene lipidoma povezane s vulnerabilnosti mozga te pojavom neurodegeneracije i/ili neuroinflamacije u određenim regijama mozga. Osim praćenja lipidoma u različitim regijama mozga (korteksu, hipokampusu i cerebelumu) analizirat ćemo lipidni sastav i u izoliranih frakcijama kasnih endosoma/lizosoma u odnosu na rane endosome u ovim regijama. Naime, kako je nakupljanje lipida u kasnim endosomima/lizosomima primarni patološki događaj lizosomalnih bolesti nakupljanja lipida cilj nam je istražiti najranije promjene lipidnog sastava ovih organela kao moguće okidače patoloških procesa. Rezultati ovog istraživanja mogli bi pokazati da modulacija određenih lipidnih vrsta može doprinijeti razvoju prevencije/liječenja ove još uvijek neizlječive bolesti. Ovaj projekt će doprinijeti razumijevanju uloge promijenjenog sastava lipida u mozgu u patogenezi dječje neurodegenerativne i još uvijek neizlječive bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC).		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Očekuje se da će se koristiti 23 ženke genotipa $NPCI^{-/-}$ i 9 mužjaka genotipa $NPCI^{+/+}$ za parenje i dobivanje miševa genotipa $NPCI^{+/+}$ i $NPCI^{-/-}$. Za analizu lipidoma u različitim regijama mozga (korteksu, hipokampusu i cerebelumu) planiramo koristiti po 6 životinja. Kako ćemo promjene lipidoma pratiti u odnosu na progresiju bolesti NPC, tj. u miševa starosti 1, 4 i 7 tjedana te u odnosu na spol i $NPCI$ genotip ($NPCI^{+/+}$ i $NPCI^{-/-}$) planiramo koristiti sveukupno 36 životinja po svakom genotipu. Nadalje, očekuje se da će se koristiti i pariti isti $NPCI^{-/-}$ miševi, u skladu sa četvrtim „R“, za dobivanje miševa genotipa $NPCI^{+/+}$ i $NPCI^{-/-}$ za određivanje lipidoma u izoliranim frakcijama ranih endosoma i kasnih endosoma/lizosoma iz različitih		

	regija mozga (korteksu, hipokampusu i cerebelumu). Promjene lipidnog sastava izoliranih vezikula pratit ćemo u odnosu na progresiju bolesti NPC, tj. u miševa starosti 1, 4 i 7 tjedana te u odnosu na spol i <i>NPC1</i> genotip (<i>NPC1</i> ^{-/-} i <i>NPC1</i> ^{+/-}) te s tim u skladu planiramo koristiti sveukupno 36 životinja po svakom genotipu.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Po završetku pokusa životinje će biti usmrćene dislokacijom vrata. Jedan tjedan stare životinje će biti dekapitirane. Sve heterozigotne životinje koje neće biti potrebno uključiti u pokus će se eutanizirati u komori ugljičnog dioksida. Očekivana je blaga razina težine postupka.
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 stanični model humane bolesti Niemann-Pick tip C (NPC). To su: a) CHO NPC1-null stanice, koje predstavljaju stanice ovarija kineskog hrčka (engl. Chinese Hamster Ovary (CHO)) u kojima je <i>NPC1</i> gen u potpunosti deletiran, i b) SH-SY5Y stanice, koje predstavljaju stanice humanog neuroblastoma, koje će biti podvrgnute tretmanu s kemijskim reagensom U18666A (najčešće korišten reagens za „oponašanje“ nakupljanja kolesterola i drugih lipida u bolesti NPC). Obje vrste gore navedenih stanica/tretmana će imitirati najznačajniji fenotip bolesti Niemann-Pick tip C što predstavlja nakupljanje kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima/lizosomima unutar stanica. Međutim, iako se početni ili preliminarni pokusi analize lipidoma u stanicama i/ili analize lipidoma u kasnim endosomima/lizosomima u odnosu na rane endosome mogu izvršiti korištenjem stanica izoliranih iz glodavaca (CHO stanice) ili stanične linije humanih stanica neuroblastoma (SHSY5Y), ove stanice ne predstavljaju <i>bona fide</i> živčane stanice koje su najbitnije stanice za izučavanje neurodegeneracije, niti glija stanice koje su najbitnije za izučavanje neuroinflamacije, obje prisutne u bolesti NPC, koja je u fokusu ovog projekta. Ovo je razlog zbog kojeg ćemo pored ovih zamjenskih metoda za izučavanje uloge promjene lipidoma u patogenezi bolesti NPC koristiti mozgove <i>NPC1</i> ^{-/-} i <i>NPC1</i> ^{+/-} miševa. Naime, cilj ovog projekta je pratiti utječu li promjene određenih lipidnih vrsta na vulnerabilnost različitih regija mozga i pojavu neurodegeneracije/neuroinflamacije. Pretpostavljamo da će u bolesti NPC cerebelum, regija mozga koja je najosjetljivija i pokazuje najznačajniju neurodegeneraciju i neuroinflamaciju, pokazati najznačajnije i najranije promjene u lipidnom sastavu moždanog tkiva u odnosu na npr. hipokampus koji je najmanje osjetljiv i ne pokazuje neurodegeneraciju/neuroinflamaciju u bolesti NPC. Ukoliko lipidom moždanih regija korteksa, hipokampusu i cerebeluma ne pokaže promjene u ukupnom sastavu i količini lipida između NPC1- i wt-miševa, pretpostavljamo da ćemo u izoliranim frakcijama kasnih endosoma/lizosoma u kojima dolazi do nakupljanja lipida usljed patogeneze bolesti NPC, detektirati promjene lipidnih vrsta. Ove analize se mogu provesti jedino korištenjem uzoraka moždanog tkiva NPC1- i wt-miševa.
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 izbjegnu 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. 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 <i>t</i>-testom za neovisne uzorke (http://vassarstats.net).
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.	3. Poboľšanje - 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 prekriven stieljom 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. Označavanje ušiju i rezanje repa koje će biti obavljeno u svrhu identificiranja životinja i njihove genotipizacije vršit će se na anestetiziranim životinjama.

