

Naslov projekta	(I) ZCI – Neuro, GA KK 01 1 1 01 0007, projekt „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“ (II) Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji (HrZZ IP-2019-04-3182).		
Trajanje projekata	01.03.2020. – 28.02.2024.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Hipoksijsko – ishemijska perinatalna ozljeda mozga, perineuronske mreže, ekstracelularni matrix		
	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).	Hipoksijsko-ishemijska (H/I) ozljeda mozga jedna je od najčešćih patologija perinatalne dobi u čovjeka. Trećina novorođenčadi s perinatalnom ozljedom mozga umire, a 20-40% od preživjelih razvija neki oblik trajnog neurološkog oštećenja uključujući cerebralnu paralizu, epilepsiju, kognitivna oštećenja i dr. (Badr i Purdy, 2006.). U znanosti se koriste mahom invazivni eksperimentalni zahvati na animalnim modelima u svrhu istraživanja posljedica hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga i mogućnosti liječenja i terapijskih pristupa (Millar i sur., 2017.). Jedan od ciljeva ovog istraživanja je uspostaviti novi neinvazivni model kontroliranog umjerenog perinatalnog oštećenja mozga na štakoru, za daljnja istraživanja oštećenja mozga, koji će biti model za oštećenja mozga koja su u praksi najčešća no uglavnom prolaze klinički ne zabilježena do dobi djece od 5-7 god. kada djeca počnu pokazivati poteškoće ne odgovorivši na zahtjeve predškolskog i ranog školskog obrazovanja. Novi model umjerenog kontroliranog hipoksijskog (H) oštećenja mozga istražit će se na molekularnoj, staničnoj i bihevioralnoj (uključujući i kognitivnu) razini.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprjeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta).	Uspostava modela umjerenog perinatalnog hipoksijskog oštećenja mozga na glodavcima (štakor) koji će komplementirati, zamijeniti dio invazivnih modela prenatalnog i perinatalnog hipoksijskog oštećenja mozga ljudskog prematurusa i novorođenčeta, i dati dodatne odgovore na otvorena pitanja.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Wistar Han® (RccHan®:WIST) štakori, ukupno 260 životinja (jednako će biti zastupljena oba spola).		

U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Očekivana težina postupaka sa životinjama tijekom istraživanja je blaga ili umjerena. Istraživanje ne uključuje invazivne, kirurške eksperimentalne postupke. Postupci kojima će životinje biti podvrgnute <i>in vivo</i> su uvjeti hipobarične hipoksije (Atm 350mmHg, pO₂ 73mmHg), odnosno normobarične perinatalne hipoksije (8% O₂, 92% N₂) u trajanju od 2 sata za tretiranu skupinu. Navedeni postupci spadaju u „umjerenu“ kategoriju. Kontrolna skupina je u normobaričnim (760 mmHg, pO₂ 159 mmHg), odnosno normoksičnim uvjetima (21% O₂, 78% N₂, 2 sata). Nakon pokusa životinje će se trajno označiti tetoviranjem, slijede bihevioralna testiranja koja se provode u dobi 30 i 70 dana (test otvorenog polja, test ploče s rupama, test socijalnog izbora, kognitivne funkcije testirati će se T – labirintom. Navedeni postupci svrstavaju se u kategoriju „blagih“ postupaka. Životinje će se žrtvovati u dobi P1 (pothlađivanje na +4°C, podlogom ispunjenom ledom, prekrivena staničevinom te transkardijalnoj perfuziji prema protokolu Gage <i>i sur.</i>, (2012): Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents; J Vis Exp; (65):1–12), a u dobi P45 i P90 prekomjernom dozom anestetika (ketamin 80mg/kg i ksilazin 10mg/kg). Usmrćivanje laboratorijskih životinja će provoditi osobe osposobljene u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja NN 102/2017, Čl. 11.; Čl. 24.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Utjecaj H/I ozljede mozga na motoričke, kognitivne i bihevioralne sposobnosti nije moguće istraživati u modelima <i>in vitro</i> ili kompjutorskim simulacijama te nije moguća zamjena animalnog modela. Modeli glodavaca su jedini opravdani, jer su evolucijski najniža vrsta koja još uvijek može dobro modelirati oštećenje SŽS čovjeka. Za blagi do umjereni model hipoksijske ozljede mozga neophodno je dokazati da postoji funkcionalni deficit te je neizbježno provođenje pokusa <i>in vivo</i> i testiranje ponašanja, a zatim i korelirati postojeći deficit s promjenama u mozgu na histološkoj i molekularnoj razini. Ne postoji alternativna metoda koja bi imitirala ovakav uzročno posljedični sustav te osigurala pouzdanost rezultata s ciljem prekliničkog istraživanja učinka hipoksijske lezije mozga na posljedične promjene sastava i strukture ECM-a i perineuronskih mreža, pa se za ovakvo istraživanje moraju koristiti eksperimentalne životinje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj životinja koji će se koristiti u istraživanju izračunat je na temelju Cohen-ove formule (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK43321/; http://www.3rsreduction.co.uk/html/6_power_and_sample_size.html) koristeći GraphPad Prism 8 (https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/) statistički program za određivanje veličine uzorka u istraživanju i temeljem recentnih istraživanja u području. Prema navedenom, u istraživanju predviđeno je ukupno 260 štakora što je najmanji mogući broj životinja za potrebe pouzdanosti statističke analize i interpretacije rezultata kako bihevioralnih, tako i histoloških i molekularnih testiranja.

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.	U ovome projektu koristi se perinatalna hipoksijska ozljeda mozga u štakora, koja po načinu nastanka i intenzitetu oponaša fetalne ozljede mozga fetusa čovjeka i primata u perinatalnoj dobi. Model ne koristi invazivne operativne metode postizanja ishemije. Za ispitivanje učinaka hipoksije koriste se bihevioralna testiranja i <i>post mortem</i> histološke i molekularne analize. Ovako dizajnirani pokusi i projekt je poboljšanje dosadašnjih animalnih modela koji se koriste u svrhu istraživanja perinatalnih ozljeda mozga. Životinje se uzgajaju u konvencionalnim uvjetima uz dezinfekcijske barijere, te pristup samo educiranom i licenciranom osoblju, kroz propisane koridore. Štakori se drže u standardnim uvjetima konvencionalne nastambe za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga uz dnevnu regulaciju ciklusa izmjene svijetla i tame 12h/12h, stalnu temperaturu okoliša od 23°C, stalnu vlažnost zraka od 50 – 60%, izmjenc zraka (11 – 12x dnevno), sterilizaciju kaveza i stelje, te standardnu prehranu standardnom hranom za miševe i štakore 4RF21 GLP (PF1610); 4RF25 GLP (PF1609); Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija i slobodan pristup vodi, u skladu s propisanim minimalnim standardima (Zakon: NN 102/2017, dopuna: NN 32/2019; Pravilnik: NN 55/2013, dopuna: NN 39/2017). Također će se provoditi obogaćivanje okoliša / kaveza koristeći skloništa ili materijale za pravljenje gnijezda. Prije ulaska u pokus životinje će se navikavati na manipulaciju radi umanjenja stresa. Istraživači koji sudjeluju u pokusima su prošli obuku u kojoj se govori o 4A odgovornih pokusa na životinjama: 1) svijest („Awareness“) o patnji koju proživljava pokusna životinja tijekom pokusa, 2) potreba da se prouče („Assess“) svi postupci na životinjama kako bi se što više 3) izbjegla („Avoid“) ili 4) ublažila („Alleviate“) patnja životinja u pokusu.
---	--

