

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Molekularni mehanizmi angiopatije u šećernoj bolesti i tumorima – uloga izravne interakcije pericita i endotelinih stanica putem RANKL/RANK sustava		
Trajanje projekta	01.11. 2020. do 01.11.2025.		
Ključne riječi (najviše do 5)	periciti, RANK, RANKL, dijabetička angiopatija, tumorska angiogeneza		
	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 istraživanja je rasvijetliti će ulogu RANKL/RANK osi u: patofiziologiji aberantne angiogeneze u dijabetesu; uloge pericita kao mogućeg izvora RANKL u patogenezi dijabetičke angiopatije; u patofiziologiji tumorske angiogeneze te uloge pericita kao mogućeg izvora RANKL u tumorskoj angiogenezi.		
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).	Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pružit će nam bolje razumijevanje uloge pericitno-endotelne komunikacije putem RANKL/RANK osi i dati nam smjernice za moguću upotrebu modulacije RANKL kao terapijskog cilja u prevenciji i liječenju dijabetičkih mikrovaskularnih komplikacija i terapiji malignih tumora.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Planira se koristiti ukupno 120 odraslih jedinki miša (<i>Mus musculus</i>) – od čega 30 $Cdh5^{cre/+}$ RANK $^{flax/flax}$ (s isključenim RANK u endotelu krvnih žila); 30 s genotipom $Cdh5^{cre/+}$ RANK $^{+/+}$ (kontrolne iz istih legala); 30 $Cspg4^{cre/+}$ RANKL $^{flax/flax}$ (s isključenim RANKL u pericitima) i 30 $Cspg4^{cre/+}$ RANKL $^{+/+}$ (kontrolne iz istih legala).		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	1) Pokus 1 - Miševi će biti usmrćeni 15 tjedana nakon intraperitonealne aplikacije streptozotocina/citratnog pufera. U životinja u kojih se razvila šećerna bolest (očekivano 40), očekuje se razvoj pretilosti, poliurije, polidipsije i gubitka tjelesne težine. U kontrolne skupine životinja (40 jedinki) ne očekuje se nikakve promjene zdravstvenog statusa. Očekivano trajanje pokusa po životinji biti će: 3 tjedna nakon aplikacije streptozotocina početi će hranjenje dijabetične skupine hranom s visokim udjelom masnoće (HFD; 60%), što će trajati do 15. tjedna. Kumulativna bolnost koja proizlazi za životinje u ovom pokusu: intraperitonealna aplikacija STZ. mogućnost da kiseli pII formulacije pII formulacije može izazvati bol		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	kod i.p. aplikacije; moguće krvarenje iz lat repne vene te opasnost od ugibanja zbog uništenja B stanica i naglog otpuštanja inzulina u krvotok (hipoglikemija). 2) Pokus 2 - B16-F0 melanoma stanice, suspendirane u PBS (gustoća 5x 10 ⁶ stanica/mL) biti će aplicirane s/c u desni bok, u volumenu 100 µL. Životinje će biti eutanazirane 13. dana nakon injekcije suspenzije tumora. Očekuje se umjereni utjecaj na zdravlje i dobrobit životinja prije eutanazije.	
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, slično kao i procesi tumorske angiogeneze, složenog su tijeka, u kojima sudjeluje mnoštvo različitih čimbenika. Kao takvi, ne može ih se adekvatno pratiti izolirane u pojedinim staničnim kulturama, budući da na iste djeluje mnoštvo čimbenika iz samih stanica dotičnog organa, reakcija krvnih žila u samome organu, ali i ostatku organizma, urastanje krvnih žila u tumorsko tkivo iz organizma domaćina, čimbenici rasta i citokini koji se tvore u samom organu, ali i u drugim dijelovima organizma, te 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 (za dobivanje dovoljno tkiva za različite analize, za dobivanje statistički valjanih zaključaka). Nakon žrtvovanja životinja, osim ciljanih tkiva (mozak, jetra, bubreg, srce, pluća, 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.	Postupke sa životinjama će provoditi/nadzirati adekvatno educirane osobe, s dugogodišnjim iskustvom u navedenim istraživanjima. Refinement mjere za Pokus 1: životinje se neće stavljati na gladovanje prije aplikacije STZ i preventivno će p.o. dobiti bolus glukoze u vodi nakon injekcije sa STZ (kako je gore opisano). Pelete hrane stavljati će se na pod kaveza sa dijabetičnim životinjama, radi lakše dostupnosti. Stelja će se izmjenjivati češće (zbog polidipsije i poliurije), a također će se češće kontrolirati dostupnost vode za piće. Refinement mjere za Pokus 2: Primjenjivati će se principi dobre veterinarske prakse	
Potrebna retroaktivna procjena projekta (upisuje nadležno tijelo)	da	<u>ne</u>
Rezultat retroaktivne procjene projekta (upisuje nadležno tijelo)		