

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Multidisciplinarna evaluacija razlike između kemijski inducirane te urođene (<i>B4Galnt1</i> -null) demijelinizacije u miša – utjecaj demijelinizacije na sastav lipidnih splavi te broj, distribuciju i vrstu interneurona		
Trajanje projekta	01.10.2020.-01.10.2021.		
Ključne riječi (najviše do 5)	kuprizon, demijelinizacija, lipidne splavi		
	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>).	Istraživanjem želimo doprinijeti razumijevanju molekularne podloge demijelinizacije izazvane genskim defektom sinteze sastavnica lipidnih splavi i utvrditi razlike ovog tipa demijelinizacije od demijelinizacije izazvane mehanizmima koji direktno utiču na preživljavanje oligodendrocita.		
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>).	Predložene studije omogućit će bolji uvid i razumijevanje spoznajama iz patofiziologije demijelinizacije u multiploj sklerozi, ali bi mogla i objasniti molekularnu podlogu ponašanja koja su posljedica drugih tipova demijelinizacije (kao npr. kod šizofrenije).		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	C57BL/6 Miš, 48 mužjaka, od toga 24 životinje starosti 3mј te 24 životinje starosti 6 mј. <i>B4Galnt1 knock out</i> genotip s isključenim genom za biositezu kompleksnih gangliozida, 48 mužjaka, od toga 24 životinje starosti 3 mј te 24 životinje starosti 6 mј. Ukupno će biti korišteno 48 mužjaka soja C57BL/6 te 48 životinja <i>B4Galnt1 knock out</i> mužjaka, što je ukupno 96 životinja.		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Zbog djelovanja kuprizona doći će do motoričkog deficita. Kako bi se umanjila patnja okoliš životinja obogatit će se prikladnim igračkama, tuljcima i kućicama. Hrana će biti ponuđena u hranilicama na dnu kaveza. U isto vrijeme pratiti će se znakovi stresa (odbijanje hrane i vode, gubitak tjelesne mase, glasanje pri dodirivanju, agresija). Također će se pratiti skala grimasa za praćenje bolnosti prilagođena laboratorijskim miševima. Ukoliko se takvi znaci pojave, životinja se odmah eutanazira. Prema iskustvu iz pilot studije (Naslov: Multidisciplinarna evaluacija razlike između kemijski inducirane te urođene (<i>B4Galnt1</i>))		

	demijelinizacije u miševa; Broj odobrenja: klasa: UP/I-322-01/18-01/25, Ur. br: 525-10/0255-18-3, projekt je odobren 14. studenoga 2018.), C57black/6 soj miševa dobro podnosi demijelinizaciju te se, nakon isključivanja kuprizona, događa potpuna remijelinizacija. Projekt je prema težini razvrstan kao umjeren.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Kako se radi o sistemskoj studiji koja je model za utjecaj gangliozida na održavanje, strukturne i fiziološke promjene lipidnih splavi u različitim strukturama centralnog i perifernog živčanog sustava model je nemoguće u cijelosti zamijeniti istraživanjima koja ne uključuju pokusne životinje. Primjena na miševima nužna je zbog izolacije lipidnih splavi iz različitih organa i tkiva što je nemoguće učiniti na kulturama stanica.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Broj životinja određen je statističkim proračunom (test jakosti studije) te je uzet minimalan broj životinja po skupini kojim studija i dalje zadržava potrebnu statističku jakost prema referenci Principles of Laboratory Animal Science, editors LFM van Zutphen, V. Baumans, AC Beynen, Elsevier, 2001.
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.	Miševi predstavljaju model na kojemu je rađen najveći broj sličnih studija a odabrani sojevi miševa nužni su za bolju uvid u enzimske defekte koji mijenjaju sastav lipidnih domena te se studija ne može izvesti u <i>in vitro</i> uvjetima. Odabrani soj miša s isključenim genom B4Galnt1 ima enzimski defekt koji mijenja sastav lipidnih domena, a prvobitni cilj studije teži boljem razumijevanju uloge lipidnih splavi. C57BL/6 soj miševa najrašireniji je soj pokusnih miševa te ih karakterizira lako rukovanje i čini ih pogodnima za korištenje u istraživačke svrhe. U pokusu će biti korišteni isključivo mužjaci miševa C57BL/6 te B4Galnt1-null jer se u ženki javlja neuroprotekcija estrogenom koji ometa demijelinizaciju i nije dobar model za opisani projekt. Protokoli koji uključuju transgenični soj miša ne uključuje postupke koji uzrokuju bol i patnju životinja. Kod te skupine mogu nastati motoričke poteškoće uslijed njihova genotipa i djelovanja kuprizona, a one se kompenziraju obogaćivanjem okoliša posebnim igračkama namijenjenima za tu svrhu. Dok ne dosegnu određenu starost pri kojoj se žrtvuju životinje su smještene u obogaćenom okolišu (tuljci za igru, kućice, papirići za izgradnju gnijezda) slobodnom od stresa. Dio protokola uključuje C57BL/6 miševe divljeg tipa. Oni će se također smjestiti u obogaćeni okoliš slobodan od stresa kao i miševi u prethodnom dijelu studije. Patnja se nadomješta uvođenjem igrački, kućica te ostalih sadržaja prikladnih za obogaćivanje okoliša. Taj dio pokusa nemoguće je predvidjeti i u potpunosti izbjeći jer je cilj

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	studije utvrđivanje promjena u lipidnom splavima koje će doprinijeti boljem razumijevanju njihove uloge u signalnim procesima te omogućiti razvoj potencijalnih terapija za specifične fiziološke procese u ljudi. Štete za životinje smanjuju se korištenjem prilagođenih posudica za hranu i vodu koje se smještavaju u niži položaj kako bi se životinje s razvijenim motoričkim poteškoćama mogle neometano hraniti.	
Potrebna retroaktivna procjena projekta (upisuje nadležno tijelo)	da	ne
Rezultat retroaktivne procjene projekta (upisuje nadležno tijelo)		

