

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Project Title: Adverse effects of single and combined mycotoxins produced by <i>Aspergilli</i> Naslov: Štetni učinci pojedinačnih i kombiniranih mikotoksina <i>Aspergillus</i> vrsta Project Title Acronym: MycotoxA																								
Trajanje projekta	1.10.2015. do 30.9.2019.																								
Ključne riječi (najviše do 5)	Mikotoksini, kombinirana toksičnost, <i>Aspergillus</i>, spore, zrak																								
Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):	<table border="1"> <tr> <td>Temeljno istraživanje</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Translacijska i primijenjena istraživanja</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Očuvanje vrste</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Visoko obrazovanje ili osposobljavanje</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Forenzička ispitivanja</td><td>da</td><td>ne</td></tr> <tr> <td>Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima</td><td>da</td><td>ne</td></tr> </table>	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
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																							
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>).	U južnoj i jugoistočnoj Europi očekuje se povećanje temperature za 4-5 stupnjeva kao i sušna razdoblja u kombinaciji s velikom količinom oborina i poplave što bi moglo uzrokovati nastanak boljih uvjeta za pojavu plijesni koje produciraju mikotoksine pa bi ljudi i životinje mogle biti izložene većim koncentracijama različitih plijesni. Ovim će se projektom istražiti je li u promijenjenim uvjetima rasta plijesni povećana učestalost pojave <i>Aspergillus</i> vrsta koje proizvode mikotoksine. Uzorci će se sakupljati u području Hrvatske u kojem je 2014. godine došlo do velikih poplava. Zbog toga će se istražiti pojavnost <i>Aspergillus</i> vrsta u hrani i zraku zatvorenih plijesnima opterećenih prostora primjenom sekvenciranja ITS/ CaM regije DNA. Zatim će se ispitati toksičnost <i>Aspergillus</i> vrsta in vitro pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti u kombinaciji s masenom spektrofotometrijom. Time će se ustanoviti jesu li u obnovljenim kućama i gospodarskim zgradama u poplavljenim krajevima prevladale vrste koje mogu sintetizirati mikotoksine. Jedan od mogućih mehanizama imunotoksičnosti, genotoksičnosti i kancerogenosti mikotoksina je oksidacijski stres čiji se nastanak može spriječiti antioksidacijskim spojevima kao što je to resveratrol. Vrlo često se u hrani više mikotoksina nalaze zajedno. Na pokusnim će se životinjama (štakorima) istraživati mehanizam djelovanja																								

	mikotoksina okratoksina A i citrinina kojima će životinje biti izložene zasebno ili zajedno. Razjasnit će se uloga oksidacijskog stresa u mehanizmu toksičnosti mikotoksina <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> određivanjem lipidne peroksidacije, staničnih antioksidanata i ekspresije proteina toplinskog šoka. Ispitat će se toksične interakcije mikotoksina (aditivnost, sinergizam, antagonizam) u kombinacija koncentracija koje odgovaraju EU limitu koristeći stanične linije i statističke modele. Moguće sprječavanje oksidacijskih učinaka mikotoksina bit će ispitano primjenom resveratrola. Rezultati će pružiti temelj za preporuke i/ili reviziju postojećih regulatornih smjernica kako bi se smanjio rizik izloženosti tim mikotoksinima za ljudsko zdravlje.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Odrasli mužjaci štakora soja Wistar, oko 60 životinja.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Pri primjenim dozama mikotoksina, prema našem iskustvu, ne očekuje se ugihanje životinja. Osim gubitka na težini, kao posljedici općeg toksičnog učinka, ne očekuju se druge negativne pojave na životinjama.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Mehanizam djelovanja mikotoksina može se istraživati na kulturama stanica pa će dio istraživanja biti proveden na kulturama stanica (stanicama hepatocelularnog karcinoma – HepG2, stanicama adenokarcinoma pluća – A549 i stanicama i stanicama monocitne leukemije – THP-1). Iako se na tim stanicama mogu istraživati neki mehanizmi djelovanja mikotoksina, na takvim se modelima ne može istražiti promjena njihove koncentracije plazmi i u ciljnim tkivima, nastanak metabolita i njihovo izlučivanje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Da bi se što više smanjio broj životinja, a da se ujedno udovolje uvjeti valjane statističke obrade, odabran je model štakora <i>Ratus norvegicus</i> (štakor) (soj Wistar) u skupinama od 4-6 životinja. Istraživanje će biti provedeno na odraslim mužjacima zato jer je ustanovljeno da su muške životinje osjetljivije na djelovanje mikotoksina od ženki. Mering S, Kaliste-Korhonen E, Nevalainen T. Estimates of appropriate number of rats: interaction with housing environment, Laboratory Animals 2001 35:80- 90.
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.	Odrasli muški štakori bolji su životinjski model od odraslih ženki štakora zato što su osjetljiviji na djelovanje mikotoksina. Zbog toga da bi se postigao toksični učinak mogu se koristiti niže doze nego za ženke. Manje doze mikotoksina smanjuju patnju životinja. Štakori su pogodniji model od miševa jer je primijećeno da su učinci mikotoksina u štakora sličniji učinku u ljudima nego što je to slučaj s

	miševima. Jedinica za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada ima dozvolu Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane za rad s laboratorijskim životinjama koje su naimjenjene pokusima. Uzgoj i pokusi provode se u uvjetima koji su u skladu sa suvremenom praksom u radu sa laboratorijskim životinjama. Životinje će boraviti u kontroliranim uvjetima mikrokoliša (temperatura zraka, osvjetljenje, relativna vlažnost zraka, buka) koji je u skladu sa standardnim operativnim postupcima pri radu u Jedinici za laboratorijske životinje. Životni prostor životinja u pokusu biti će obogaćen na način da životinje mogu iskazati raspon svojeg uobičajenog ponašanja a da to ne ugrožava očekivani ishod istraživanja. Reference: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition (National Academies Press, 2010).
--	--