

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Otkrivanje interakcija između domaćina i nametnika pomoću transkriptomike																								
Trajanje projekta	Rujan 2015. – lipanj 2018.																								
Ključne riječi (najviše do 5)	Transkriptom, transkriptomika, infekcija, <i>Anisakis</i> , zoonoza																								
	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																							
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Cilj ovog projekta je dobiti transkriptom domaćina i nametnika prilikom prodiranja infektivne ličinke <i>Anisakis</i> sp. kroz sluznicu probavila štakora, često popraćenog upalnom reakcijom u homeotermnom domaćinu (štakoru, dupinu ili čovjeku), što će pružiti odgovore na mnoga epidemiološka pitanja vezana za infekciju ličinkama roda <i>Anisakis</i> . Ovo istraživanje bi po prvi puta primijenilo metodologiju sekvencioniranja nove generacije u kontekstu <i>Anisakis</i> epidemiologije, što je u skladu s najnovijim trendovima u molekularnoj biologiji i parazitologiji.																								
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).	Saznanja koja bi se stekla korištenjem transkriptomike i nove generacije sekvencioniranja bi pružila uvid u putove infekcije homeotermnog domaćina, i složenu interakciju između domaćina i nametnika. Ovo istraživanje bi moglo predstavljati ključni korak za budući razvoj ciljanih terapeutika u slučaju zaraze nametnikom roda <i>Anisakis</i> u čovjeka.																								
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Planira se koristiti Sprague Dawley ženke štakora (<i>Rattus norvegicus</i>), mase 250 grama. Za preliminarno istraživanje planira se korištenje po tri životinje za svako predviđeno uzorkovanje (nakon 6, 12, 24, 72 i 96 sati), a iz literature je utvrđeno da pojedina životinja mase od 250 grama može biti zaražena sa 10 ličinki nametnika (Zuloaga et al., 2013; Jeon i Kim, 2015). Ukupan planirani uzorak za preliminarno istraživanje je 18 životinja te kasnije tokom provođenja pokusa možemo smanjiti ili povećati broj uzorkovanja s obzirom na rezultate dobivene u preliminarnom istraživanju. U finalnom pokusu planiramo imati 36-42 životinje, što uključuje i skupinu korištenu za preliminarno istraživanje. (N=18).																								
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Prvo je neophodno utvrditi točno vrijeme (u h) prodiranja ličinke kroz sluznicu probavila nakon uvođenja infektivnih ličinki <i>Anisakis</i> sp. u probavilo štakora gastričnom sondom, odnosno točno vrijeme spiralizacije ličinke na površinu visceralnih organa nakon prodiranja. U finalnom pokusu, životinje će se ponovno pokusno inficirati, žrtvovati u prethodno određenim vremenskim razdobljima (prodiranje, spiralizacija), a njihova tkiva i izolirane ličinke će se po usmrćivanju uzorkovati u svrhu pripreme za RNA sekvencioniranje, kao i za histološku, IHC i TEM pretragu.																								
Primjena načela 3R																									
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti	Životinje su potrebne kako bi se mogle ustanoviti genska ekspresija ličinke u homeotermnom domaćinu, odnosno genska ekspresija domaćina u zaraženom tkivu. Ličinke se ne mogu uzgajati u modelima																								

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

alternativne metode koje ne uključuju životinje.	linija stanica, niti se tako može simulirati infekcija.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Izračunat je minimalan broj potrebnih životinja, s obzirom na uzorkovanje tkiva u svrhe RNA sekvenciranja, gdje su neophodne tri replike po stanju, i histologije (klasične, IHC, TEM).
3. Poboľjšanje 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.	Sprague Dawley ženke štakora će se koristiti jer su prethodna istraživanja utvrdila da najbolje podnose pokusnu manipulaciju i infekciju <i>Anisakis</i> sp. Pregledom recentne literature odlučili smo se za životinjski model štakora jer se sve češće koriste za infekciju nametnicima orogastričnim putem (pr. Zuloaga et al., 2013; Romero et al., 2013; Jeon i Kim, 2015), te se koriste kao modelni organizam za imunološki odgovor čovjeka. Iako je u istu svrhu u upotrebi i mišji model, korištenje veće životinje će nam omogućiti infekciju pojedine životinje s većim brojem nametnika i smanjiti ukupni broj životinja koje je potrebno žrtvovati. Tijekom pokusa infekcije, ženke štakora će biti anestezirane kako bi se strah, bol i patnja sveli na minimum. Prilikom uzorkovanja, pokusno inficirane životinje nametnikom, će se usmrtiti predoziranjem anestetikom u gore navedenim vremenskim intervalima. Eksperimentalne tehnike se temelje na načelu poboljšanja tako da se moguća bol, patnja, tjeskoba ili trajno oštećenje uzrokovano životinjama ukloni ili smanji na najmanju moguću mjeru. Životinje će se prije intubacije anestezirati mješavinom anestetika i analgetika (Xylapan, 5-10 mg/kg i Ketaminol, 50-100 mg/kg, i.p.), te će se njegovo djelovanje provjeriti putem testa refleksa štipanja nožnih prstiju (toe pinch reflex ili pedal withdrawal reflex). Ako životinja na test reagira refleksom, dodati će se odgovarajuća dodatna doza Ketaminola (do 50-100 mg/kg) kako bi se uspostavila razina anestezije koja ne uzrokuje refleks. Usmrćivanje će se provesti administracijom prevelike doze anestetika (>150 mg/kg Ketaminola) te će se dodatno napraviti dekapitacija kako bi se utvrdio nastanak smrti. Uzimanje uzoraka tkiva se planira nakon potvrde nastanka smrti životinje, kako bi životinje bile pošteđene patnje.