

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Citoprotektivna i imunoregulacijska svojstva glikoproteina 96 i metalotioneina Pokus I: Citoprotektivna i imunoregulacijska svojstva glikoproteina 96 i metalotioneina u eksperimentalnom autoimunom encefalomijelitisu u DA i AO štakora Pokus II: Učinci oksidativnog stresa izazvanog preopterećenjem željezom na eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis u DA štakora		
Trajanje projekta	1.7.2016 – 30.9.2017.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Glikoprotein 96, metalotioneini, eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis, željezo, oksidativni stres		
	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 ovog znanstvenog projekta je utvrđivanje uloge glikoproteina 96 (gp96) i metalotioneina (MT) u procesima aktiviranih tkivnim oštećenjima različitih etiologija. Pokus I: Gp96 nadzire procese proteinske biogeneze i degradacije denaturiranih proteina, utječe na procese stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze te potiče razvoj antigen-specifične imunosti prema vlastitim peptidima i nekim bakterijama, sudjelujući u stvaranju autoagresivnih i regulacijskih klonova T limfocita. Različita tkivna oštećenja potiču i sintezu cisteinom bogatih metaloproteina - MT, koji otpuštanjem cinkovih i drugih iona reguliraju staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu te sprječavaju djelovanje slobodnih kisikovih i dušikovih radikala i nastanak toksičkih produkata lipidne, proteinske i DNA oksidacije. Stoga su ciljevi ovog pokusa: istražiti molekularne mehanizme kojima gp96 i MT kontroliraju procese proliferacije, apoptoze i reparacije tkiva u normalnim i patološkim uvjetima i sudjeluju u održavanju tolerancije na vlastite antigene. Analizirat će se promjene i razlike u izražaju gp96 i MT, s pripadajućim receptorima (CD91, TLR i megalin) i pro-upalnim citokinima (IL-6, TGF-β1 i osteopontin) izazvanima autoimunom procesom unutar <u>eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa</u> (EAE-a). Promjene će se istraživati na mjestima tkivnih oštećenja (mozak, leđna moždina), te na razini timusa i jetre u štakora različitih osjetljivosti na indukciju EAE-a (Dark Agouti - DA i Albino Oxford - AO). Pokus II: Obzirom na činjenicu da novija istraživanja ukazuju na to da bi jedan od početnih poticaja za oštećenje neurona mogli biti depoziti željeza u pojedinim regijama mozga, cilj ovog znanstvenog projekta je utvrditi ulogu željeza (Fe) u razvoju oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije u središnjem živčanom sustavu, određujući malondialdehid i 4-hidroksinonenal kao indikatore lipidne peroksidacije, te posljedične promjene vezane uz nastanak i tijek kliničkih promjena u eksperimentalnom autoimunom		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	encefalomijelitisu (EAE-u) kao modelu za proučavanje multiple skleroze (MS). Želimo također utvrditi postoje li pri tome i izražene spolne razlike u kliničkom tijeku bolesti kod mužjaka i ženki Dark Agouti (DA) štakora. Također ćemo pratiti izražaj metalotioneina i glikoproteina 96 u tkivima izloženim oksidativnom stresu, kao jednom od mehanizama tkivnog oštećenja, zbog njihovih citoprotektivnih i imunoregulacijskih svojstava.
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>).	Pokus I: Očekujemo dobivanje novih podataka o mehanizmima koji predstavljaju prvu linije obrane u reakcijama na oštećenje i vrše imunološki nadzor nad vlastitim antigenima tijekom narušavanja tkivnog integriteta koje se odvija u autoimunom procesu. Pokus II: Rezultati dobiveni u animalnom modelu multiple skleroze (MS) ukazat će na moguću ulogu željeza u patogenezi EAE-a, odnosno MS, na ulogu spola u regulacijskim funkcijama željeza tijekom autoimunskih bolesti te na eventualne prednosti i opasnosti primjene preparata željeza u bolesnika oboljelih od MS.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U pokusu I koristit će se 45 mužjaka laboratorijskih štakora soja Dark Agouti (DA) i 45 mužjaka laboratorijskih štakora soja Albino Oxford (AO), što ukupno iznosi 90 životinja. U pokusu II koristit će se mužjaci i ženke DA štakora u ukupnom broju od 140 životinja (70 mužjaka i 70 ženki).
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Životinje će razviti relapsirajuće-remitirajući oblik EAE-a pri čemu je u fazama relapsa bolesti smanjena pokretljivost životinja i moguća je pojava inkontinencije. Što se tiče pokusa I , obzirom da su AO štakori rezistentni na indukciju bolesti težina postupka će za njih biti blaga . Za DA štakore koji će razviti kliničke simptome bolesti težina pokusa bit će umjerena . U pokusu II smatramo da će za DA štakore koji će biti izloženi samo preopterećenju željezom i one koji će biti tretirani fiziološkom otopinom i encefalitogenom težina pokusa biti umjerena . Za štakore koji će biti preopterećeni željezom i dodatno senzibilizirani encefalitogenom, postupak bi mogao biti težak . Sve životinje se u određenim točkama pokusa usmrćuju, prema predviđenom protokolu, zbog uzimanja organa za potrebe istraživanja.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	U pokusu će se koristiti standardni animalni modeli koji omogućuju <i>in vivo</i> istraživanja procesa regeneracije tkiva i održavanja tolerancije na vlastite antigene tijekom narušavanja morfoloze te patogeneze multiple skleroze. Obzirom da je cilj ispitivanje interakcije na razini više organskih sustava, nismo u mogućnosti laboratorijske životinje zamijeniti modelom staničnih kultura. Zbog etičkih razloga nije moguće provesti odgovarajuća istraživanja na humanoj populaciji. Upravo stoga razvijen je životinjski model multiple skleroze – eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Tijekom istraživanja koristit će se najmanji mogući broj životinja po ispitivanim grupama koji je dobiven uz pomoć programa Statistica 12 (Power Analysis – Sample Size Calculation) iz kojeg će se moći dobiti dovoljna količina uzoraka tkiva za analizu i pri tome statistički relevantne podatke. Uzorci tkiva će se pažljivo alikvotirati i pohraniti na -80°C kako bismo imali što više materijala za analizu i tako izbjegli uvođenje dodatnih životinja u pokus.
3. Pобољшanje Objasniti izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasniti opće mjere koje će se	Eksperimentalni autoimunosni encefalomijelitis (EAE) je životinjski model multiple skleroze. U većini slučajeva multipla skleroza započinje kao relapsirajuće - remitirajući oblik. Upravo se ovaj oblik bolesti razvija kod genetski osjetljivih štakora soja Dark Agouti (DA) nakon indukcije bolesti homogenatom bijele tvari govedeg mozga u kombinaciji s kompletnim Freundovim adjuvansom. Nasuprot tome,

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje.	Albino Oxford (AO) štakori na isti postupak senzibilizacije ne razvijaju kliničke simptome bolesti. Značajno je da ovaj životinjski model vrlo dobro odražava autoimunosna zbivanja do kojih dolazi kod multiple skleroze pa je stoga vrlo pogodan za primjenu u istraživanjima. Životinje su tijekom pokusa smještene u propisanim mikroklimatskim uvjetima i pomno se prate. Kod uznapredovale kliničke slike životinjama se posvećuje dodatna pažnja i njega. O svakodnevnim potrebama životinja brigu će voditi timaritelj, a dodatni nadzor će provoditi osobe uključene u izvođenje pokusa na životinjama. Sve osobe uključene u rad sa životinjama imaju završen tečaj osposobljavanja za rad s laboratorijskim životinjama. Životinje će se radnim danom, tijekom radnog vremena obilaziti 2-3 puta, a vikendom su organizirana dežurstva u nastambi, tako da osoba koja je dežurna obilazi životinje tijekom jutra, a uz to će jedna od osoba uključenih u izvođenje pokusa obići životinje i poslijepodne. Nepokretne životinje se namjesti tako da leže ispod pojilice kako bi mogle što lakše doći do vode te se uz to dodatno napajaju tijekom kontrolnih obilazaka, stavlja im se hrana u kavez (uz glavu životinje) kako bi im bila lakše dostupna. Također će im se mijenjati položaj tijela pri svakom obilasku da se održi cirkulacija. U slučaju pojave bilo kakvih komplikacija koje izlaze iz okvira pokusa, konzultirat će se nadležni veterinar ustanove (Marko Šestan, dr. med. vet.) i po potrebi primijeniti humana krajnja točka.
--	--

