

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Uloga progesterona u reproduktivnim i nereproduktivnim tkivima		
Trajanje projekta	1.7.2016.-31.8.2018.		
Ključne riječi (najviše do 5)	Progesteron; Progesteronski receptor; Reprodukcijska		
	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).	Progesteron (P) je preko progesteronskih receptora (PR-A i PR-B) regulator ženske reprodukcije, a ima važnu ulogu i u nereproduktivnim organima. Relativni omjer PR-A/PR-B ovisi o endokrinološkom statusu organizma i mijenja se tijekom kancerogeneze. Ova dva proteina su transkripcijski čimbenici koji nastaju transkripcijom iz jednog gena i strukturno su identični osim što je PR-B ima peptidni dodatak na N-terminalnom kraju. Disfunkcija progesterona je povezana s reproduktivnim poremećajima (endometriozom, neplodnost), rakom (rak jajnika, rak dojke, karcinom endometrija, karcinom prostate), metaboličkim poremećajem (rezistencija na progesteron, pretilost, osteoporoza), kardiovaskularnim oštećenjem (aneurizma aorte) i neurološkim oštećenjem (migrene, vrtoglavice). Molekularni mehanizmi odgovorni za učinke progesterona u fiziološkom i patofiziološkom stanju su u velikoj mjeri nepoznanica. Premda strukturno gotovo identični PR-A i PR-B su medijatori biološke aktivnosti progesterona koji posjeduju različitu transkripcijsku aktivnost. Fokus ovih istraživanja pronalaženje molekularnih mehanizama i markera kojima PR-A i PR-B selektivno djeluju u endometriju. Dva su cilja našeg projekta: Cilj I. Istražiti molekularne mehanizme kojima P preko PR, odnosno PR-A i PR-B izoforme kontrolira proliferaciju stanica endometrija, prijemčivost uterusa, decidualizaciju stromalnih stanica i P ovisnu imunomodulaciju tijekom rane trudnoće. Cilj II. Istražiti molekularne mehanizme gena reguliranih P/PR spregom tijekom rane trudnoće. Kako se vrlo malo pokusa ove vrste može lako i etički provesti na ljudima u ovom istraživanju koristit će se genetski modificirani miševi koji zbog ciljane genetske modifikacije izražavaju samo PR-A (PRBKO) ili PR-B (PRAKO) izoformu, te miševi koji ne izražavaju PR (PRKO).		
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)	Neplodnost postaje veliki socioekonomski problem s kojim se u zapadnim razvijenim zemljama susreće 1 od 12 parova u dobi ispod 15 godina. Ovaj problem je prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) u nerazvijenim zemljama i značajno veći. Zbog toga je od izuzetne važnosti otkriti molekularne mehanizme koji su uključeni u uspostavljanje i održavanje trudnoće kako bi se mogla bolje razumjeti		

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

	etiologija ovog problema, a time i uspješnije razviti terapije i bolje tehnike potpomognute oplodnje. Poznavanje molekularnih mehanizama djelovanja progesterona i estrogena također može imati važne implikacije u razumijevanju, a posljedično i u liječenju karcinoma reproduktivnih organa. Rezultati ovih istraživanja dovest će do boljeg pojašnjenja mehanizama progesteronskog receptora u uspostavljanju i održavanju trudnoće. Očekujemo da će ovaj projekt pozitivno utjecati na razvoj temeljnih biomedicinskih istraživanja i obrazovanje mladih istraživača na Sveučilištu u Rijeci i u Hrvatskoj.
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	U istraživanju koristit će se laboratorijski miševi. Tijekom iduće dvije godine planiramo koristiti 324 miša u predloženom istraživanju.
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama, vjerojatna / očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	Predloženo istraživanje ima 2 cilja. Pokusi u okviru svakog od tih ciljeva imaju svoje specifičnosti. U okviru Cilja I ženke PRKO⁺, PRAKO⁻, PRBKO⁺ i WT će biti podvrgnute ovarijektomiji u starosti od 6-8 tjedana. Ovarijektomija će biti izvedena na mišicama koje će biti anestezirane kombinacijom ketamin/ksilazin anestetika, ketamina 0,1 mg/g težine, a ksilazina 0,02 mg/g težine prema Protokolu za anesteziju i analgeziju kojeg propisuje Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC. Mišicama će biti administrirana analgezija za otklanjanje boli, patnje ili tjeskobe prije operativnog zahvata sukladno Protokolu za anesteziju i analgeziju kojeg propisuje Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC, primjenom Buprenorfina kojeg sadrži lijek Animalgesics for mice (Animalgesic lab, http://animalgesiclabs.com/; http://animalgesiclabs.com/Mice_Package.pdf). Animalgesics for mice će se administrirati potkožno (igla 27G). Nakon oporavka od ovarijektomije (2 tjedna), mišice će biti podvrgnute hormonskom tretmanu u trajanju od nekoliko sati (progesteron) do nekoliko dana (estrogen, estrogen-progesteron i sezamovo ulje). Ženkama će se potkožno injicirati progesteron (P) (1mg; 100µl), estrogen (E) (250ng; 125µl) i estrogen progesteron (EP) (250ng/2,5mg; 125µl) i kontrola sezamovo ulje (S.O.; 125µl). Ovi tretmani se često primjenjuju u istraživanjima vezanim za reprodukciju. Ne očekuje se da će ženke osjetiti više od prolazne blage nelagode ubodom igle propisane veličine prilikom injiciranja (igla 25G), te se neće anestezirati prilikom ovog postupka. Nakon završenog tretmana ženke će se eutanazirati cervikalnom dislokacijom prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55-13). U okviru Cilja II ženke divljeg tipa (BALB/c) starosti 8-12 tjedana bit će stavljene na rasplod s plodnim mužjacima. Jutro kad je uočen vaginalni plak, smatrat će se 0,5 danom trudnoće (dpc - <i>days post coitum</i>). Ženke će biti eutanizirane cervikalnom dislokacijom prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55-13) na 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5, 8,5, 9,5 i 11,5 dpc. Ne očekujemo da će pokusni miševi pokazivati znakove boli i tjeskobe. Ukoliko se kod pojedinih miševa tijekom provedbe pokusa u okviru Ciljeva I i II primijete teški znakovi stresa, boli, nelagode bez mogućnosti brzog oporavka nakon primjene analgezije, gubitak težine veći od 20%, te nepokretnost duža od 24h, miševi će biti izuzeti iz pokusa i usmrćeni primjenom humane krajnje točke.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena	Za ostvarenje svih predloženih ciljeva ovom projektu ne postoje

Ministarstvo poljoprivrede
Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane

Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	znanstveno prihvatljive alternativne metode opisane u literaturi koje ne uključuju pokusne životinje. Ova su istraživanja neprovediva na pacijentima zbog etičkih i tehničkih ograničenja. Istraživanja utjecaja progesterona preko progesteronskih receptora na fiziologiju reproduktivnih i nerekativnih organa, te uspostavljanje i održavanje trudnoće nije moguće istražiti samo na <i>in vitro</i> eksperimentima jer ona ne mogu dati cjelovit uvid u funkcioniranje cijelog organizma sisavaca.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja.	Na temelju prethodnih istraživanja, statističkih analiza te preciznog dizajna pokusa, broj miševa koji se planira koristiti u pokusima sveden je na minimalnu razinu.
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.	U ovom istraživanju koristit ćemo mišje modele kojima nedostaju pojedine izoforme progesteronskog receptora, koji su najprikladniji za ostvarenje predloženih ciljeva. U svrhu provođenja poboljšanja dobrobiti pokusnih miševa, o njima će se brinuti educirane i stručno osposobljene osobe. Nadalje, provoditi će se svakodnevno praćenje pokusnih miševa kako bi se pravovremeno primijetila umjerena do jaka bol, patnja ili tjeskoba miševa te iste uklonile ili smanjile na najmanju moguću mjeru primjenom analgezije. Ukoliko se pojave teži znakovi slabosti, boli, tjeskobe i nagli gubitak težine, miševi će biti izuzeti iz pokusa te će se primijeniti humana krajnja točka. Nadalje, miševi će biti smješteni u grupama maksimalno do 5 miševa u kavezu u sustavima sa ventilacijom prostorije koja ima preciznu kontrolu vlage i temperature. Na kraju pokusa miševi će biti eutanazirani u skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13).

